

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Entwicklung und Anwendung eines
Expressionsklonierungssystems in
primären Kardiomyozyten -
Identifizierung von Translin als
neuem Target der Herzinsuffizienz**

**Kay Brinkmann
Northeim**

2003

Erklärung:

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29.01.1998 von Prof. Dr. Horst Domdey betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung:

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, 09.10.2003



Kay Brinkmann

Dissertation eingereicht:	10.10.2003
1. Gutachter:	Prof. Dr. Horst Domdey
2. Gutachter:	Prof. Dr. Eckhard Wolf
Tag der mündlichen Prüfung:	09.12.2003

Patente

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sowie darauf basierende Anwendungen werden durch folgende internationale Patente geschützt:

- "DNA constructs and vectors for the inducible expression of nucleotides"
Patentanmeldung eingereicht: 60 / 470, 918
- "Use of Translin"
Patentanmeldung eingereicht: MG-KA / 03-04
- "Selection system for substances which modify coding RNAs"
Patentnummer: DE 10210284
- "Dilated Cardiomyopathy Associated Gene-2 (DCMAG-2):
A cytoplasmatic inducer of sarcomeric remodeling in cardiomyocytes"
Patentnummer: WO 03059948
- "Use of ERK-2"
Patentnummer: WO 03 / 025205
- Validierung von zwei neuen Zielproteinen der Herzinsuffizienz
Beide Patentanmeldungen ausstehend

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Dr. Volker Rönicke, Dr. Thomas Henkel und Dr. Martin Funk für die Vergabe des Themas, die wissenschaftliche Betreuung, ihre stete Hilfsbereitschaft und die wertvollen Ratschläge bei der Durchführung der Arbeit.

Prof. Dr. Horst Domdey danke ich für die Vertretung dieser Arbeit vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München und sein in mich gesetztes Vertrauen.

Bei Dr. Peter Heinrich und Dr. Johanna Holldack möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, meine Arbeit in der MediGene AG, Martinsried / München, durchführen zu können, wodurch mir wertvolle Einblicke in die spannende Branche der Biotechnologie gewährt wurden.

Dr. Birgit Reuner und Dr. Isabel Klier möchte ich meinen Dank für die Durchführung der Patentanmeldungen und die vorangegangenen zeitintensiven Literaturrecherchen aussprechen. Weiterhin gilt mein Dank Dr. Oliver Stoss für die Experimente zur Bestimmung von Genexpressionsprofilen sowie Dr. Stéphane Leclair für seine Unterstützung bei molekularbiologischen Aufgaben. Dr. Veronika Hauser, Christiane Faltermeier, Gabi Wexel und Martina Knödler danke ich für ihre flexible Kooperation bei der Durchführung erster *in vivo* Experimente am Klinikum Rechts der Isar.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Kardiologie danke ich für die hilfsbereite Zusammenarbeit und die freundschaftliche, kreative Arbeitsatmosphäre.

Insbesondere möchte ich mich hiermit bei Myriam, Sabine und Steffi (dem Zellkultur-Team), Angelika, Barbara und Susi (Cloning-Center-Europe), Falko und Sigi (MDG-Bike-Tours), sowie Britta, Christina und Dana (Personal- and Team-Assistance) für ihre herzliche Unterstützung bedanken.

Abschließend danke ich ganz herzlich Sigrid Brinkmann und Friedhelm Nullmeier für ihre fortwährende liebevolle Unterstützung während meiner Promotionszeit.

Inhaltsverzeichnis

A.	Zusammenfassung	1
B.	Einleitung	4
1.	Das insuffiziente Herz	6
1.1.	Klinische Parameter der Herzinsuffizienz	7
1.2.	Zelluläre Parameter der Herzinsuffizienz	9
1.3.	Molekulare Parameter der Herzinsuffizienz	10
1.4.	Medizinische Therapien zur Behandlung der Herzinsuffizienz	12
2.	Methoden zur Validierung von Zielproteinen der Herzinsuffizienz	14
3.	Aufgabenstellung: Das Expressionsklonierungssystem	17
C.	Material / Methoden	19
1.	Material	20
1.1.	Bakterienstämme	20
1.2.	Eukaryontische Zelllinien	20
1.3.	RNA-Banken	20
1.4.	cDNA-Banken	20
1.5.	Plasmide	21
1.6.	Oligonukleotide	21
1.7.	Chemikalien	22
1.8.	Molekularbiologische und biochemische Reagenzien	22
1.9.	Reagenzien der Zell- und Viruskultur	23
1.10.	Material und Geräte der Zell- und Viruskultur	23
1.11.	Allgemeines Labormaterial und Geräte	24
2.	Methoden	25
2.1.	Molekularbiologische Methoden	25
2.1.1.	Präparation von Plasmid-DNA	25
2.1.2.	Analyse von Plasmid-DNA	27
2.1.3.	Aufreinigung von DNA	28
2.1.4.	Modifizierung rekombinanter DNA	29
2.1.5.	Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA	32
2.1.6.	In vitro Rekombination (Gateway-System)	33
2.1.7.	Generierung rekombinanter Adenovirusgenome (AdEasy-System)	36
2.1.8.	Induzierbares Expressionssystem (Gene-Switch)	38
2.2.	Methoden der Zellkultur	40
2.2.1.	HeLa, HEK Erhaltungskultur	40
2.2.2.	Transiente Transfektion von HeLa Zellen	40

2.2.3.	Isolierung primärer Kardiomyozyten	41
2.2.4.	Kultivierung primärer Kardiomyozyten	42
2.2.5.	Kollagenbeschichtung von Objektträgern	42
2.3.	Methoden der Viruskultur	43
2.3.1.	Verpackung rekombinanter Adenoviren	43
2.3.2.	Amplifikation rekombinanter Adenoviren	44
2.3.3.	HEK 293 Zellaufschluss	44
2.3.4.	Aufreinigung rekombinanter Adenoviren	44
2.3.5.	Titerbestimmung rekombinanter Adenoviren	45
2.3.6.	Aufreinigung adenoviraler DNA	45
2.4.	Analyse der rekombinanten Expression	46
2.4.1.	Adenovirale Infektion primärer Kardiomyozyten	46
2.4.2.	Luminometrische Expressionsanalyse	46
2.5.	Morphometrie transduzierter Zellen	47
2.5.1.	Zellfixierung	47
2.5.2.	Analyse morphologischer Parameter	47
D.	Ergebnisse	48
	Übersicht	49
1.	Regulierbares Expressionssystem	51
1.1.	Generierung rekombinanter Adenovirusvektoren	52
1.2.	<i>In vitro</i> Charakterisierung des rekombinanten Adenovirus pKA3	66
1.2.1.	Induzierbares Expressionssystem in HeLa Zellen	66
1.2.2.	Induzierbares, virales Expressionssystem in Kardiomyozyten	68
1.2.2.1.	Abhängigkeit der Expression vom Virustiter	68
1.2.2.2.	Abhängigkeit der Expression von der Mifepriston-Konzentration	71
1.2.2.3.	Zeitabhängigkeit der Expression	73
1.2.3.	Rekombinante Adenoviren zur Expression toxischer Proteine	75
2.	Normalisierte cDNA-Bank des humanen Herzens	80
2.1	Microarray- und Sequenzanalysen der cDNA-Bank	81
2.2	cDNA-Pools	88
3.	Zelluläres System	95
3.1.	Rekombinante Expression in Kardiomyozyten	96
3.1.1.	Kulturbedingungen	96
3.1.2.	Transduktion der Kardiomyozyten mit rekombinantem AV pKA	96
3.1.3.	Pathologische Relevanz der Morphologie von Kardiomyozyten	98
3.1.3.1.	Veränderung der Morphologie nach extrazell., hypertropher Stimulation	98
3.1.3.2.	Veränderung der Morphologie nach rekombinanter Expression	101
3.2.	Analyse morphologischer Parameter	103
3.2.1.	Abstraktion der Zellform	103
3.2.2.	Zellanalyse mittels Laser Scanning Cytometer	106

4.	Expressionsklonierung in Kardiomyozyten	111
4.1.	Statistische Auswertung morphologischer Parameter	112
4.1.1.	Induktion pathologischer Morphologien durch extrazell. Stimulation	113
4.1.2.	Induktion pathologischer Morphologien durch rek. Expression	115
4.2.	Analyse der Morphologie nach Transduktion mit cDNA-Pools	119
5.	Funktionelle Charakterisierung von Translin	121
5.1.	Struktur- / Funktionsbeziehung von Translin	122
5.2.	Assoziation mit der humanen Erkrankung	127
E.	Diskussion	129
1.	Das Expressionsklonierungssystem in primären Kardiomyozyten	130
1.1.	Korrelation der Herzinsuffizienz <i>in vivo</i> mit zell. Parametern <i>in vitro</i>	131
1.2.	Charakteristik einer cDNA-Bibliothek zur Analyse herzspez. Gene	133
1.3.	Generierung eines Vektorsystems zur Analyse der cDNA-Bibliothek	135
1.3.1.	Adenoviren als Vektorsystem	135
1.3.2.	Rekombinatorische Klonierung zur Integration von cDNAs	136
1.3.3.	Regulierbare Expression von cDNAs	137
1.3.4.	Finale Generierung und Verwendung des Vektorsystems pKA	140
1.4.	Entwicklung eines automatisierten Screeningverfahrens	143
1.5.	Die Expressionsklonierung im Vergleich zu etablierten Screeningverfahren	147
2.	Charakterisierung eines potenziellen Targets: Translin	150
2.1.	Zellbiologische Funktion von Translin	150
2.2.	Pathologische Bedeutung von Translin in der Herzinsuffizienz	153
2.3.	Translin als therapeutisches Target der Herzinsuffizienz	155
F.	Literaturverzeichnis	158
G.	Abkürzungen	172

A. Zusammenfassung

In den Industrienationen sind Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems die häufigste Todesursache. Allein das multifaktorielle Syndrom der Herzinsuffizienz führt beispielsweise in den USA zu 300.000 Todesfällen pro Jahr (Hunt et al., 2001). Das symptomatische Unvermögen des Herzens, eine ausreichende Blutversorgung der Organe zu gewährleisten, kann zum gegebenen Zeitpunkt nicht effizient therapiert werden. Das Ziel der medizinischen Forschung besteht daher in der Aufklärung der komplexen molekularbiologischen Mechanismen des Herzens, um kausal mit der Pathologie assoziierte Moleküle zu detektieren. In der vorliegenden Arbeit wurde zu diesem Zweck ein Expressionsklonierungssystem in primären Kardiomyozyten zur Validierung neuer Zielproteine der Herzinsuffizienz entwickelt und angewendet.

Basierend auf der Korrelation zwischen der hypertrophen Morphologie *in vitro* kultivierter Kardiomyozyten und der Pathologie der Erkrankung *in vivo* (Gerdes, 2002), wurden in primären Herzmuskelzellen der Ratte cDNAs des humanen Herzens exprimiert und auf Induktion pathologischer Zellformen untersucht. Um eine umfassende Analyse zu ermöglichen, wurde zunächst eine normalisierte cDNA-Bibliothek des humanen Herzens generiert und charakterisiert. 3.456 cDNAs wurden anschließend durch rekombinatorische Klonierung in das spezifisch dafür entwickelte regulierbare Adenovirus-Vektorsystem pKA3 integriert. Insgesamt wurden 288 rekombinante Adenoviruspools zur Expression von jeweils 12 cDNAs in drei Leserahmen generiert. Nach viraler Transduktion und Induktion der Expression wurden die Morphologien der Zellen analysiert. Mittels automatisierter „Laser Scanning Cytometry“ (fluoreszenzbasierte Analyse von Zellfläche und -umfang) wurden 288 Zellpopulationen vermessen. Hierbei wiesen acht Populationen eine pathologisch hypertrophe Morphologie auf. Dieses zellbasierte Screeningverfahren ermöglichte erstmals die funktionelle Charakterisierung krankheitsassoziierter Proteine auf der Basis objektiver und quantifizierbarer morphologischer Parameter.

Durch diese Untersuchungen wurde das Protein Translin, welches an posttranskriptionalen Prozessen der mRNA-Regulation sowie der Translation beteiligt ist (Han et al., 1995; Wu et al., 1998), als möglicher Induktor der Hypertrophie identifiziert. Obwohl Struktur und Funktion von Translin in der Literatur seit langem bekannt sind, wurde eine Assoziation des Proteins mit der Herzinsuffizienz erstmalig in dieser Arbeit erkannt.

Eine heterologe Überexpression von Translin in primären Kardiomyozyten verursachte die Ausbildung einer pathologisch maladaptiven Morphologie. Diese *in vitro* Daten korrelierten mit einer verstärkten Expression von Translin im Gewebe des insuffizienten humanen Herzens. Literaturdaten lassen den Rückschluss zu, dass Translin spezifische, mit der Erkrankung assoziierte mRNAs bindet und ihre Translation supprimiert. Derartige Deregulationen der Genexpression, wie sie potentiell auch Translin verursacht, haben einen bedeutenden Einfluss auf die Progression der Herzinsuffizienz (Misquitta et al., 2001).

Auf Grund der in dieser Arbeit gewonnenen Daten kann Translin somit als neues Target der Herzinsuffizienz angesehen werden. Die Inhibition seiner pathologischen Funktion stellt einen innovativen Ansatzpunkt zur Entwicklung erster Medikamente zur kausalen Behandlung der Progression der Herzinsuffizienz dar.

B. Einleitung

“The heart, with the veins and arteries and the blood they contain, is to be regarded as the beginning and the author, the fountain and the original of all things in the body, the primary cause of life.”

William Harvey
Arzt, Anatom, Physiologe
Warden, Meron College, Oxford, 1628

1. Das insuffiziente Herz

Das Herz-Kreislauf-System gewährleistet die permanente und effiziente Versorgung aller Organe und Gewebe des Körpers mit Metaboliten und Sauerstoff. Dem Herzmuskel als zentralem Element kommt hierbei die Aufgabe zu, durch koordinierte Kontraktion und Relaxation einen kontinuierlichen Blutstrom zu erzeugen. Das Herz vermag pro Sekunde ca. 70 ml Blut zu pumpen, im Verlauf eines Menschenlebens kontrahiert das Organ etwa drei Milliarden Mal und transportiert dabei fast 2×10^8 Liter Blut (Fuster et al., 2001). Diese enorme Leistungsfähigkeit kann jedoch nur unter exakter Kontrolle des genetischen Programms der Herzzellen sowie durch Adaption an variable physiologische und pathophysiologische Stimuli gewährleistet werden (Nicol et al., 2000).

Eine dauerhafte pathologische Einschränkung der Pumpfunktion des insuffizienten Herzens führt zu einer Verminderung der körperlichen Kondition bis hin zur massiven Einschränkung der Lebensqualität und erhöhter Mortalität (Baker, 2002). Auf Grund struktureller oder funktioneller Störung des Organs zeigen Patienten unter anderem pathologisch veränderte hämodynamische Parameter, Flüssigkeitsretention, Dyspnoe sowie eine reduzierte Leistungsfähigkeit (Hunt et al., 2001). Die Mortalitätsrate beträgt im ersten Jahr 20 %, innerhalb der folgenden fünf Jahre versterben etwa 50 % der herzinsuffizienten Patienten. Allein in den Vereinigten Staaten von Amerika leiden etwa fünf Millionen Menschen an dieser Erkrankung. Trotz zunehmender Fortschritte in der Therapierbarkeit, der Ausarbeitung medizinischer Richtlinien und enormer Investitionen des Gesundheitssystems (24 Milliarden US\$ in den USA), nimmt die Zahl der Todesfälle (300.000 Patienten in den USA) stetig zu (Gaballa und Goldman, 2002; Hunt et al., 2001; Mann, 1999). Die Herzinsuffizienz stellt daher weltweit ein schwerwiegendes, bislang von der Medizin nicht kausal therapierbares Gesundheitsproblem dar.

Als Ätiologie werden Erkrankungen angesehen, die eine akute oder anhaltende Überlastung des Herzens induzieren. Hierzu zählen Bluthochdruck, koronare Herzkrankheiten, Herzklappenfehler, Herzmuskelschädigungen durch Viren oder Toxine sowie idiopathische Ursachen (Katz, 2001).

1.1. Klinische Parameter der Herzinsuffizienz

Klinische Untersuchungen mit bildgebenden Verfahren beweisen in vielen Fällen eine hypertrophe Progression der linksventrikulären Herzinsuffizienz. Um den Verlust der Herzleistung zu kompensieren, wird die Wandstärke des linken Ventrikels durch konzentrische Hypertrophie vergrößert. Während dieser hypertrophen Phase, die im Folgenden als adaptiv bezeichnet wird, bleiben die Patienten zumeist asymptomatisch oder zeigen nur schwache Anzeichen der Insuffizienz (Chien, 1999). Nach einer undefinierten Übergangszeit, die von wenigen Monaten bis zu Jahren andauern kann, können die Patienten jedoch die Symptome einer schweren Herzinsuffizienz entwickeln. Die Pumpleistung kann sich soweit vermindern, dass selbst im Ruhezustand der Körper nicht mehr ausreichend versorgt wird. Die Lebenserwartung der Patienten sinkt auf etwa 14 Monate (Mann, 1999). Im Verlauf dieser Dekompensation der Herzfunktion wird das Volumen des linken Ventrikels erhöht, während sich gleichzeitig seine Wandstärke verringert. Dieser Phänotyp der exzentrischen Hypertrophie, die im weiteren Verlauf des Textes als maladaptiv benannt wird, ist als dilatative Kardiomyopathie beschrieben (Hildebrand, 1998). Die physiologischen Konsequenzen der anatomischen Veränderungen können durch das Gesetz von LaPlace erklärt werden:

$$\textit{Stress} = \frac{\textit{Druck} \cdot \textit{Kammerdurchmesser}}{\textit{Wandstärke}} \quad (\textit{Lionel}, 1998)$$

Hierbei wird die durch Druckanstieg oder Volumenzunahme erzeugte Überlastung des Organs als Wandstress definiert. Die adaptive Hypertrophie führt somit durch Erhöhung der Wandstärke zur Reduktion des pathologischen Wandstress und Aufrechterhaltung der normalen Leistungsfähigkeit. Die maladaptive Hypertrophie des insuffizienten Herzens kann zunächst zwar ein erhöhtes, pathologisches Füllvolumen der Kammer ausgleichen, jedoch übt der vergrößerte Kammerdurchmesser in Kombination mit der reduzierten Wandstärke zusätzlichen mechanischen Stress auf das Organ aus, welcher schließlich nicht mehr kompensiert werden kann (Carabello, 2002). Die morphologischen Veränderungen während der Pathogenese des Organs werden in der Abbildung 1 dargestellt.

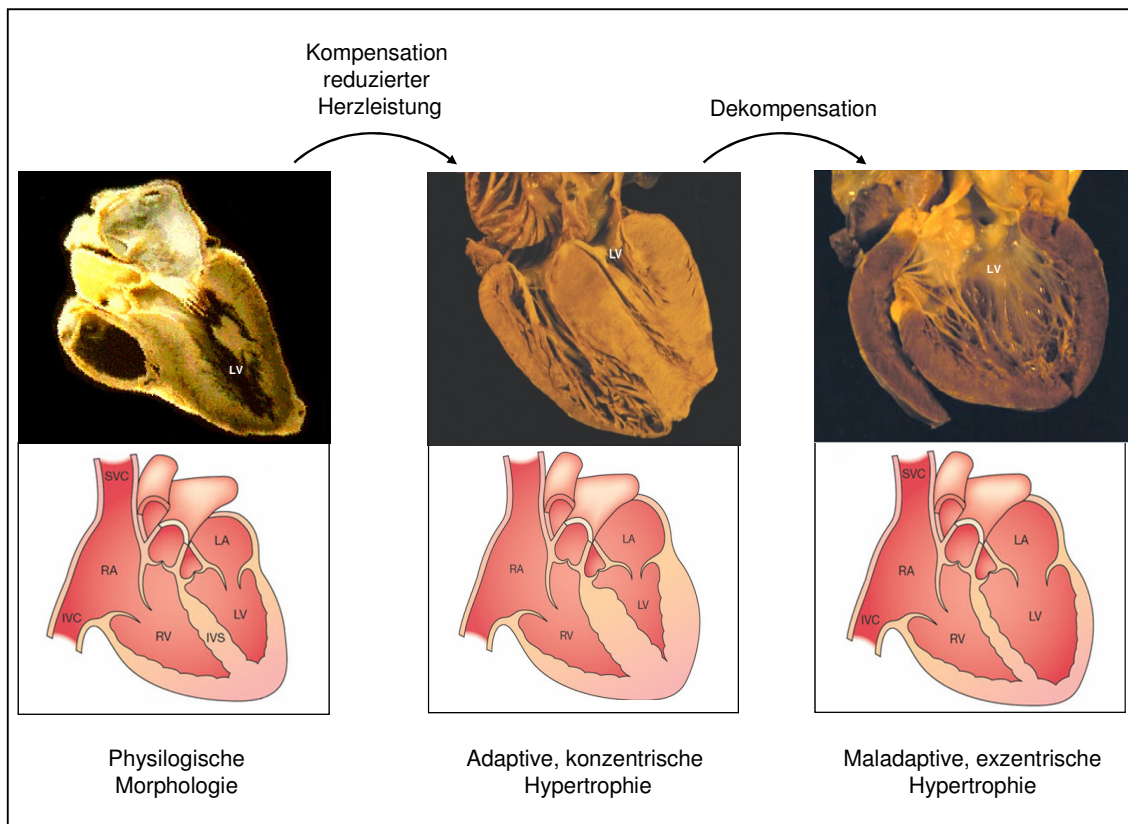


Abbildung 1: Herzmorphologie während der Pathogenese des insuffizienten Organs

Eine pathologische Einschränkung der Herzfunktion kann zunächst durch adaptive, konzentrische Hypertrophie des linken Ventrikels kompensiert werden. Infolge der Progression der Insuffizienz kann das Organ die erhöhte Leistung nicht mehr aufrechterhalten. Unter Verringerung der Wandstärke des linken Ventrikels und Erhöhung des Kammervolumens bildet das Herz eine maladaptive, exzentrische Hypertrophie aus, die zu einer weiteren Reduktion der Herzleistung führt.

- LV: linker Ventrikel
 - LA: linkes Atrium
 - RV: rechter Ventrikel
 - RA: rechtes Atrium
 - IVS: interventrikuläres Septum
 - SVC: Vena cava superior
 - IVC: Vena cava inferior
- (nach Towbin und Bowles, 2002)

1.2. Zelluläre Parameter der Herzinsuffizienz

Die makroskopischen Veränderungen des insuffizienten Herzens spiegeln sich auch auf zellulärer Ebene wieder (siehe Abbildung 2). Sowohl klinische Daten als auch Tiermodelle zeigen, dass sich der Querschnitt der Herzmuskelzellen während der Pathogenese der adaptiven Hypertrophie vergrößert (Gerdes, 2002). Unter Zunahme der Syntheserate kontraktiler Proteine werden die neuen Sarkomere parallel in den Zellen angeordnet (Carabello, 2002). Hieraus resultiert ein Anstieg der Kontraktionskraft. Kardiomyozyten aus Herzen mit maladaptiver Hypertrophie weisen hingegen eine signifikante Elongation der Morphologie auf (Tamura et al., 1998). Die kontraktile Einheiten werden hierbei seriell arrangiert, wodurch jedoch keine Zunahme der Kontraktilität erzielt werden kann. Die Verlängerung der Zellen spiegelt die Dilatation des Ventrikels wieder und wird als kritischer Übergangspunkt bei der Entwicklung zum dekompensierten Organ angesehen (Gerdes, 2002; Hunter und Chien, 1999).

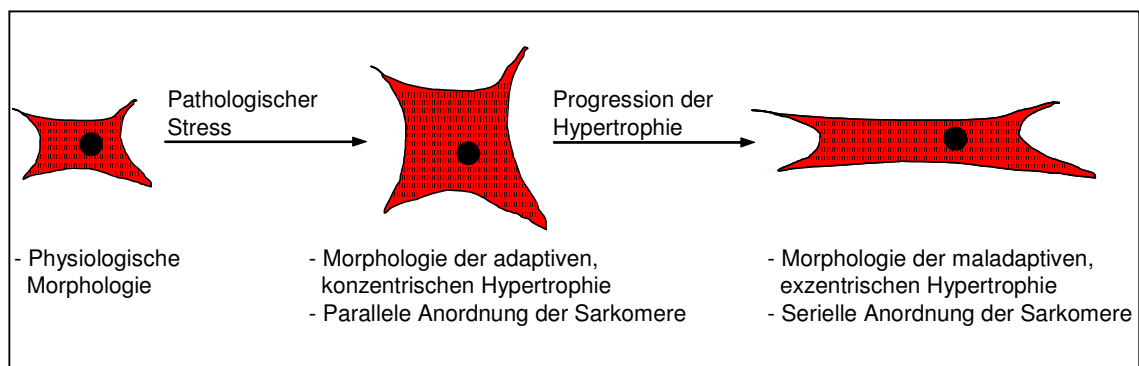


Abbildung 2: Morphologie der Kardiomyozyten während der Pathogenese der Herzinsuffizienz

Auf zellulärer Ebene spiegelt sich die initiale Pathogenese der Herzinsuffizienz durch eine Vergrößerung des Kardiomyozytenquerschnitts wieder. Durch parallele Anordnung neuer kontraktile Einheiten wird die Kontraktilität der Zelle während der adaptiven Hypertrophie erhöht. Während der Progression der Erkrankung zur maladaptiven Hypertrophie findet eine Elongation der Zelle statt. Die hierbei seriell angeordneten Sarkomere tragen nicht zur Erhöhung der Inotropie bei.

(vereinfacht nach Grossman et al., 1975; Hunter und Chien, 1999)

1.3. Molekulare Parameter der Herzinsuffizienz

Auf molekularer Ebene manifestiert sich die Pathogenese der Herzinsuffizienz durch ein geändertes Muster der Transkription und Translation sowie durch posttranslationale Modifikationen (Katz, 2003; Mann, 1999). Die Ätiologie kann zum einen durch erworbene genetische Defekte begründet sein (Grunig et al., 1998; Maron, 1997; Michels et al., 1992). Zum anderen kann die hypertrophe Antwort auch durch extrazelluläre pathophysiologische Stimuli induziert werden. Durch physikalische, endokrine, parakrine sowie autokrine Signale (z. B. Wachstumsfaktoren, Hormone, Zytokine) werden spezifische Signaltransduktionswege aktiviert, die schließlich zu funktionellen und strukturellen Veränderungen der Herzzelle führen (Force et al., 2002; Garrington und Johnson, 1999; Katz, 2001).

Die Induktion der Signaltransduktion erfolgt nach direkter Bindung der Liganden an ihre Rezeptoren aus den Gruppen der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, Kinaserezeptoren und Zytokinrezeptoren oder durch dehnungsinduzierte Aktivierung von Ionenkanälen und Signalmolekülen (Gudi et al., 1998; Hu und Sachs, 1997; Karmazyn et al., 1999; Katz, 2001; MacKenna et al., 1998; Ruwhof und van der Laarse, 2000). Die intrazelluläre Weiterleitung eines Signals erfolgt durch reversible Konformationsänderungen, Phosphorylierung oder Spaltung spezifischer Moleküle eines Signalweges. Während der kaskadenartigen Transduktion kann das Signal verstärkt und auf Grund zahlreicher Interaktionen einzelner Signalwege zur Modifikation verschiedener Zielmoleküle auf DNA- oder Proteinebene führen.

Im initialen Stadium der Pathogenese kann beispielsweise durch gezielte Aktivierung der β -adrenergen Signaltransduktion und daraus resultierender Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration die kontraktile Funktion des Organs aufrechterhalten werden (Post et al., 1999). Derartige funktionelle Veränderungen induzieren durch posttranslationale Modifikationen bestehender zellulärer Strukturen eine Adaption des Herzens an den pathologischen Stress. Eine lang anhaltende neurohumorale Stimulation kann jedoch durch Hyperaktivierung und Modulation der Signaltransduktion die Progression zur Dekompensation des Herzens einleiten (Katz, 2003; Mann, 1999). Durch Veränderungen des

Genexpressionsmusters werden in der Zelle strukturelle Modifikationen des Sarkomers, des Zytoskeletts, der extrazellulären Matrix, der Calcium-Regulation bis hin zu nekrotischen und apoptotischen Prozessen induziert, die schließlich zur Remodellierung des Herzens führen (Hein et al., 2003; McKinsey und Olson, 1999). Die anatomischen und physikalischen Veränderungen des Herzens während der Pathogenese der Insuffizienz sind folglich durch komplexe, aktive Prozesse auf molekularer Ebene bedingt (Cohn, 1995; Wollert et al., 1996). In der folgenden Abbildung 3 werden einige Signaltransduktionswege in Kardiomyozyten schematisch dargestellt.

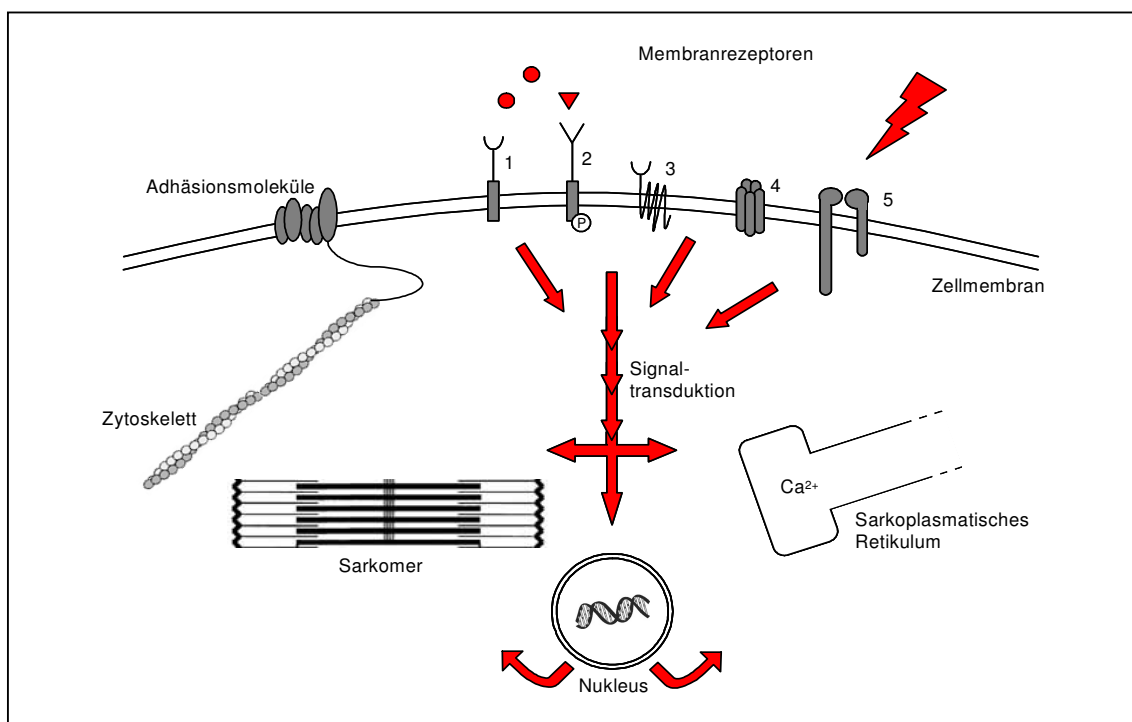


Abbildung 3: Pathologische Aktivierung der Signaltransduktion in Kardiomyozyten

Nach Aktivierung von Transmembranrezeptoren durch Ligandenbindung oder biomechanischen Stress werden spezifische zelluläre Signaltransduktionswege induziert. Durch posttranslationale Modifikationen können beispielsweise Strukturproteine des Zytoskeletts, der extrazellulären Matrix sowie Proteine des Sarkomers, des Metabolismus oder der Calcium-Homöostase funktionell verändert werden. Weiterhin führt die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren zu einem modifizierten Genexpressionsmuster. Die daraus resultierenden Veränderungen des Proteoms tragen ebenfalls zur Pathogenese bei. In der späten Phase der maladaptiven Hypertrophie führen die pathologischen Modifikationen schließlich zu einer Umstrukturierung der Zelle.

- 1: Zytokinrezeptor
- 2: Kinaserezeptor
- 3: G-Protein-gekoppelter Rezeptor
- 4: Ionenkanal
- 5: Integrinrezeptor

(nach Force et al., 2002; Hefli et al., 1997; Nicol et al., 2000)

1.4. Medizinische Therapien zur Behandlung der Herzinsuffizienz

Die Relevanz der anatomischen Veränderungen von Herzgröße und -form war bereits Medizinern des 18. Jahrhunderts bekannt. So wurde schon im Jahr 1769 die Kausalität zwischen Überlastung und Hypertrophie des Herzens postuliert (Morgagni, 1769). Im 19. Jahrhundert wurde die konzentrische Hypertrophie als adaptive Reaktion des Herzens und Protektion vor der Progression zur exzentrischen Hypertrophie angesehen (Katz, 1998). Der Fortschritt der medizinischen und molekularbiologischen Forschung des 20. Jahrhunderts führte schließlich zur Entwicklung erster chirurgischer und pharmakologischer Therapien, die jedoch auf den neuen Theorien der pathologischen Hämodynamik und neurohumoralen Signaltransduktion beruhten (Francis et al., 1984; Harris, 1983; Starr et al., 2002; Subramanian und Patel, 2001). Die Bedeutung der morphologischen Aspekte bei der Progression der Insuffizienz wurde hierbei vernachlässigt (Katz, 2003). Die Medikamentenentwicklung beschränkte sich daher zunächst auf die Behandlung der funktionellen pathologischen Effekte des Herzens wie Vasodilatation, Flüssigkeitsretention und unphysiologischer Calcium-gesteuerter Kontraktion. Klinische Langzeitstudien bewiesen jedoch, dass die Medikamente zwar eine initiale Verbesserung hämodynamischer Parameter induzierten, aber gleichzeitig zu einer verschlechterten Prognose der Herzinsuffizienz führen konnten (Katz, 2000; Packer und Cohn, 1999).

Erst im letzten Jahrzehnt wurde begonnen, die molekularen Mechanismen, die zu strukturellen Modifikationen der Zelle führen, aufzuklären und mit den makroskopischen morphologischen Veränderungen während der Progression der Herzinsuffizienz zu korrelieren (Katz, 2003). Neue Studien belegen, dass etablierte Medikamente auch pathologische Signaltransduktionswege für derartige strukturelle Modifikationen positiv beeinflussen können. So können Medikamente, deren ursprüngliche Indikation in der Verringerung des Gefäßwiderstands (ACE-Inhibitor) oder negativer Inotropie (β -Blocker) lag, durch Signalblockade maladaptiver Stimuli die progressive Dilatation des Herzens reduzieren (CIBIS-Investigators und Committees, 1999; Lechat et al., 1998; Packer und Cohn, 1999).

Neben den pharmakologischen Therapien konnte auch durch neu entwickelte chirurgische Methoden der biophysikalische Stress sowie die resultierende Aktivierung pathologischer neurohumoraler Faktoren des insuffizienten Herzens gesenkt werden. Beispielsweise wird nach Implantation einer mechanischen Pumpe zur Unterstützung der linksventrikulären Funktion eine signifikante Regression der maladapiven Hypertrophie sowohl auf Ebene der Zellen als auch des Organs detektiert (Zafeiridis et al., 1998).

Diese viel versprechenden Ergebnisse belegen, dass durch gezielte Modifikation auf molekularer Ebene die Progression der Herzinsuffizienz und eine damit verbundene pathologische Remodellierung des Organs unterbunden oder sogar revertiert werden kann. Zur Entwicklung effektiver kausaler Therapien müssen jedoch die komplexen zellulären Mechanismen der Herzinsuffizienz aufgeklärt werden (Wang, 2001).

Die biomedizinische Forschung muss daher sowohl durch gezielte Untersuchungen auf molekularer Ebene der Kardiomyozyten als auch durch morphologische Studien die pathologischen Prozesse detektieren und neue Zielmoleküle definieren, die ursächlich an der Entwicklung der Hypertrophie und des Übergangs zur Dilatation des Herzens beteiligt sind (Cohn, 2002).

2. Methoden zur Validierung von Zielproteinen der Herzinsuffizienz

In den letzten Jahrzehnten wurden die molekularen Ursachen einer Erkrankung zumeist über Analyse des Phänotyps mit nachfolgender aufwendiger Detektion kausaler Gene erforscht. Infolge des Fortschritts der molekularbiologischen Forschung konnte die Validierung der in einer Krankheit involvierten Zielmoleküle (Targets) optimiert werden (Auerbach et al., 2002; Ryu und Nam, 2000).

Nach der vollständigen Entschlüsselung des humanen Genoms steht der Wissenschaft nun die genetische Basis zur Aufklärung der molekularen Mechanismen des Organismus zur Verfügung (Lander et al., 2001; Venter et al., 2001). Um die Regulation der 30.000 Gene des Menschen zu untersuchen, wurden Methoden der funktionellen Genomik zur Analyse der genetischen Expressionsprofile entwickelt (Sellers und Yates, 2003). Mittels RNA-Hybridisierungstechniken und DNA-Microarrayanalysen können in Hochdurchsatzverfahren komplexe Muster zellulärer Genaktivitäten erstellt werden, um beispielsweise differenziell im erkrankten Organ exprimierte Gene zu detektieren (Chanda und Caldwell, 2003; Schena et al., 1995; Shields und O'Halloran, 2002).

Um jedoch die Funktionsweise der Zellen zu verstehen, müssen die Eigenschaften der von den Genen kodierten Produkte – der Proteine – aufgeklärt werden. Die Herausforderung, Struktur, Funktion, Lokalisation, Modifikation, Interaktion und Aktivität der potenziell 1,5 Millionen humanen Proteine aufzuklären, stellt das Aufgabenfeld der so genannten Proteomik dar (Sellers und Yates, 2003; Van Regenmortel, 2001). Durch *in vitro* Analyse der Moleküle auf Protein- oder Antikörperarrays, gelelektrophoretische Auftrennungen oder Interaktionsanalysen in heterologen Zellsystemen können enorme Datenmengen zur Charakterisierung von Proteinen gewonnen werden (Koh et al., 2002; Tyers und Mann, 2003). Mittels bioinformatischer Algorithmen werden die korrelativen Daten der Gen- und Proteinanalyse anschließend unter biologischen oder medizinischen Aspekten ausgewertet. Die Aussagekraft der genannten Systeme wird jedoch durch ihren unphysiologischen Modellcharakter stark eingeschränkt (Chanda und Caldwell, 2003). Daher muss die

weiterführende funktionelle Analyse der Proteine in einem homologen Zellkultursystem durchgeführt werden. Entsprechende Assays dienen als *in vitro* Filter, um potenzielle Zielproteine, die bei molekularmedizinischen Fragestellungen beispielsweise mit einer Krankheitsentwicklung assoziiert sind, aus den vorangegangenen Hochdurchsatzanalysen zu validieren und in nachfolgende *in vivo* Modelle zu überführen. Auf Grund der biologischen Komplexität der zellbasierten Modellsysteme erzielen sie einen erhöhten Validierungsgrad der untersuchten Proteine, allerdings ermöglichen die zeit- und arbeitsintensiven Assays zumeist keinen hohen Durchsatz (Chanda und Caldwell, 2003). Der beschriebene Ablauf der Identifikation, Charakterisierung und Validierung von Zielproteinen wird im nachfolgenden Fließschema der Abbildung 4 aufgeführt.

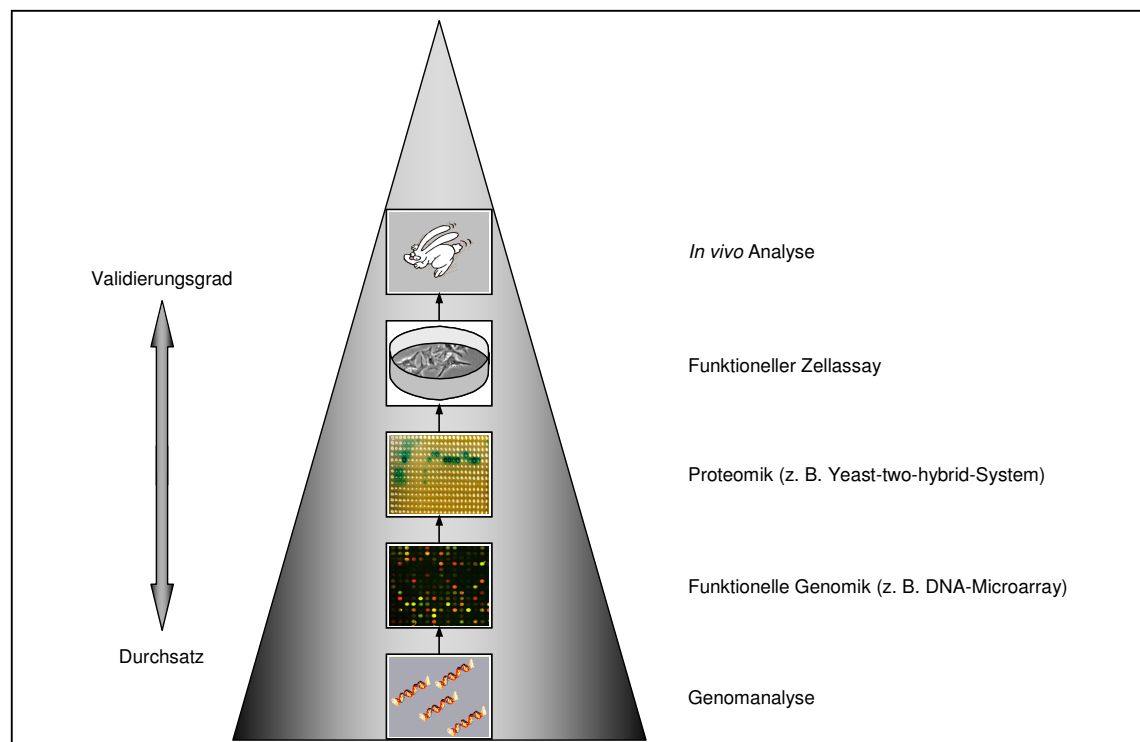


Abbildung 4: Detektion und Validierung von Zielproteinen

Durch DNA-Sequenzanalysen werden genomische Daten erstellt. Durch Methoden der funktionellen Genomik können anschließend spezifische Expressionsprofile der Gene ermittelt werden. In heterologen Zellsystemen oder auf Microarrays werden die von den Genen kodierten Proteine auf Interaktion und Modifikation untersucht. Potenzielle Zielproteine müssen nachfolgend im homologen Zellkultursystem funktionell charakterisiert und abschließend im Tiermodell validiert werden. Im Verlauf der Analyse steigt der biologische Informationsgehalt und der Validierungsgrad potenzieller Zielmoleküle an, auf Grund der ansteigenden Komplexität der Modellsysteme sinkt jedoch der Durchsatz der untersuchten Moleküle.

(nach Chanda und Caldwell, 2003)

Trotz zunehmender Automatisierung und Parallelisierung der Screeningmethoden stellt jedoch die direkte Funktionsanalyse überexprimierter Gene im zellulären System noch immer eine bedeutende Herausforderung dar (Koh et al., 2002; Ziauddin und Sabatini, 2001). Wegen der hohen technischen und biologischen Anforderungen an die einzelnen Komponenten derartiger Expressionsklonierungssysteme sind erst wenige, wenn auch viel versprechende Untersuchungen beschrieben worden (Koh et al., 2002; Pennica et al., 1995). Die Möglichkeit einer systematischen Evaluierung der Funktion von Genen und ihrer Assoziationen mit zellulären physiologischen oder pathophysiologischen Prozessen weist diesen Analysesystemen jedoch eine hohe Bedeutsamkeit zu (Chanda und Caldwell, 2003). Der Aufbau eines Expressionssystems im homologen Zellkultursystem stellt daher auch im Bereich der molekularen, kardiologischen Forschung eine große Herausforderung dar, um mit einer hohen Durchsatzrate neue, funktionell an der Herzinsuffizienz beteiligte Gene zu identifizieren.

3. Aufgabenstellung: Das Expressionsklonierungssystem

Auf Grund der nur unzureichend geklärten molekularen Mechanismen der Progression der Herzinsuffizienz und des medizinischen Bedarfs an neuen, kausal mit der Krankheit assoziierten Proteinen, sollte in der vorliegenden Arbeit ein Expressionsklonierungssystem für die Targetfindung in primären Kardiomyozyten entwickelt und angewendet werden.

Basierend auf den Transkripten des humanen Herzens sollte eine normalisierte cDNA-Bibliothek hergestellt und charakterisiert werden. Die cDNA-Bank sollte anschließend effizient in ein zu generierendes adenovirales Vektorsystem integriert werden. Zur funktionellen Analyse der Genprodukte waren anschließend primäre Kardiomyozyten der Ratte mit den rekombinanten Adenoviren zu transduzieren. Basierend auf der beschriebenen Korrelation des Phänotyps der Kardiomyozyten und der Pathologie der Herzinsuffizienz sollten die Zellen auf hypertrophe morphologische Veränderungen analysiert werden. Hierzu war ein reproduzierbares, objektives Screeningverfahren zu entwickeln, welches durch Automatisierung einen möglichst hohen Analysedurchsatz ermöglichen sollte.

Im Expressionsklonierungssystem detektierte potenzielle Zielproteine sollten abschließend isoliert und mit weiterführenden Methoden charakterisiert werden. In Abbildung 5 wird der Aufbau des Expressionsklonierungssystems in primären Kardiomyozyten schematisch dargestellt.

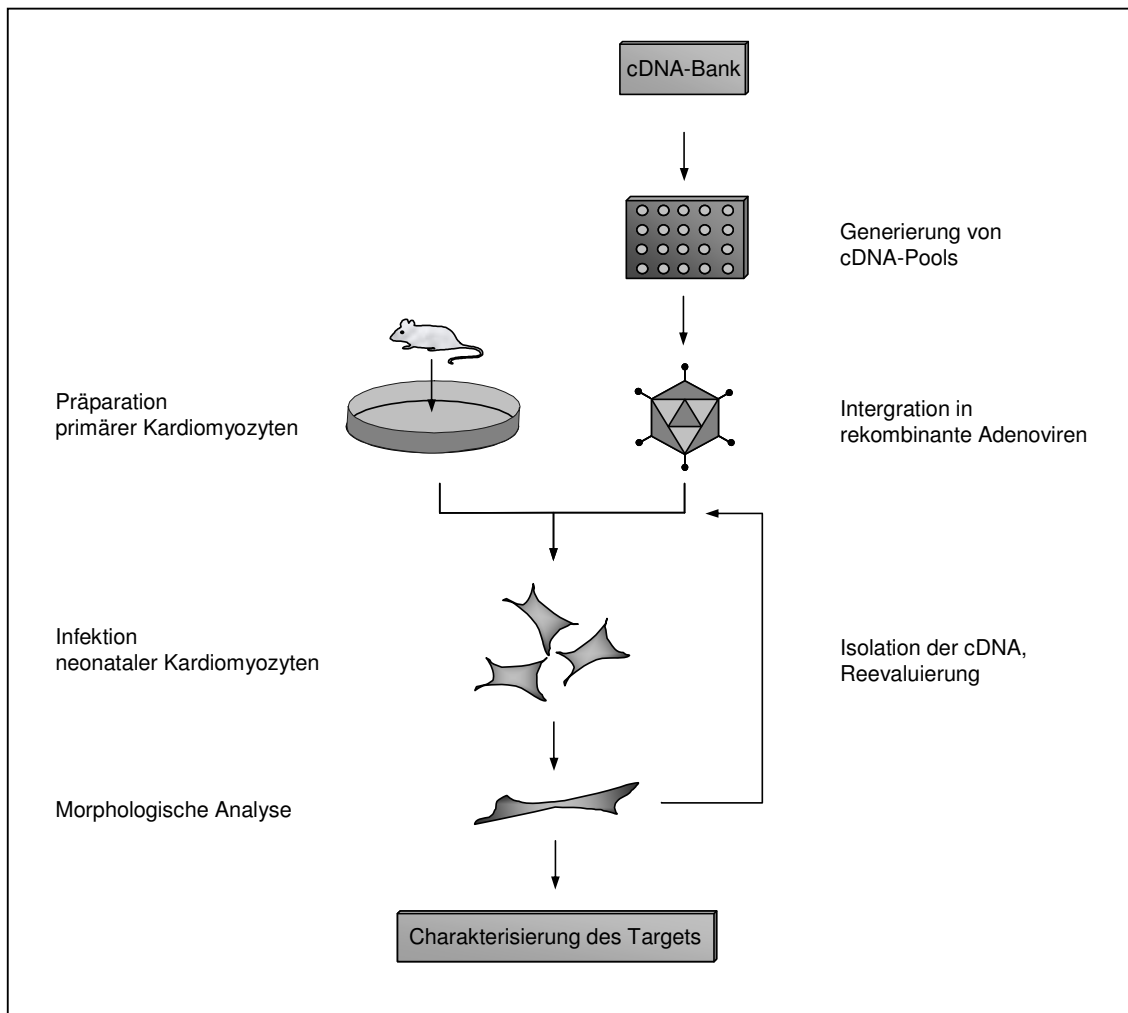


Abbildung 5: Fließschema des Expressionsklonierungssystems in Kardiomyozyten

Eine cDNA-Bank wird in rekombinante Adenoviren integriert. Primäre Kardiomyozyten der Ratte werden mit den rekombinanten Viren infiziert und auf morphologische Veränderungen untersucht. cDNAs, deren Genprodukte die pathologische Morphologie induzieren, werden identifiziert und in weiteren Experimenten charakterisiert.

C. Material / Methoden

1. Material

1.1. Bakterienstämme

<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ , endA1, hsdR17, supE44, thi-1, recA1, gyrA, relA1, Φ 80lacZ Δ M15, Δ (lacZY A-argF), U169
<i>E. coli</i> BJ 5183	andA, sbcBC, recBC, galK, met, thi-1, bioT, hsdR
<i>E. coli</i> DH10B	F ⁻ , mcrA, Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15, Δ lacX74, deoR, recA1, endA1, araD139, Δ (ara, leu)7697, galU, galK, λ , rpsL, nupG
<i>E. coli</i> DB 3.1	F ⁻ , gyrA462, endA ⁻ , Δ (sr1-recA), mcrB, mrr, hsdS20(r _B ⁻ m _B ⁻), supE44, ara14, galK2, lacY1, proA2, rpsL20(Sm ^r), xyl, λ ⁻ , leu, mtl1

1.2. Eukaryontische Zelllinien

HeLa	humane Cervixkarzinoma-Zelllinie, ATCC # CCL-2
HEK 293	humane, embryonale Nierenepithel-Zelllinie, transformiert mit den Genen E1A und E1B des Adenovirus Ad5, ATCC #CRL-1573
C2C12	murine Myoblasten-Zelllinie, ATCC # CRL-1772
3T3-L1	murine Fibroblasten-Zelllinie, ATCC # CL-173
HWP	humane Präadipozyten-Zelllinie, PromoCell # C-1237

1.3. RNA-Proben aus humanem Herzgewebe

RNA #100	Gesamt-RNA isoliert aus linksventrikulärer Gewebeprobe des humanen Herzens, Phänotyp: dilatative Kardiomyopathie, Explantation: 20.09.1996, MediGene AG, Martinsried
RNA #6	Gesamt-RNA isoliert aus linksventrikulärer Gewebeprobe des gesunden humanen Herzens, Explantation: 06.07.1997, MediGene AG, Martinsried

1.4. cDNA-Banken

cDNA-MF	Normalisierte cDNA-Bank aus linksventrikulärem Gewebe des humanen Herzens Zur Generierung der cDNA-Bank wurden RNA-Isolationen aus fünf Gewebeproben des gesunden Herzens (520 μ g RNA) sowie fünf Gewebeproben des an dilatativer Kardiomyopathie erkrankten Herzens (900 mg RNA) verwendet. Normalisierung nach Patent WO 99 / 15702, Life Technologies (Invitrogen Corporation) Rockville, MD, USA, MediGene AG, Martinsried
---------	---

1.5. Plasmide

pCI	Vektor zur konstitutiven Expression in Säugerzellen, 4008 Bp, Promega, Mannheim
pShuttle	Transfervektor zur homologen Rekombination mit pAdEasy, 6621 Bp, Qbiogene, Heidelberg
pAdEasy1	Vektor mit Sequenz des Adenovirus Ad5 ($\Delta E1$, $\Delta E3$), zur Rekombination mit pShuttle, 33441 Bp, Qbiogene, Heidelberg
pSwitch	Vektor zur Expression eines chimären Transkriptionsfaktors, 7323 Bp, Gene-Switch, Invitrogen, Karlsruhe
pGene / V5-HIS A	Vektor zur induzierbaren Expression, 4594 Bp, Gene-Switch, Invitrogen, Karlsruhe
pDONR212	Vektor zur Rekombination mit einem Expressionsklon, 4470 Bp, Gateway-System, Invitrogen, Karlsruhe
pKA1 - pKA4	Vektor zur Herstellung rekombinanter Adenoviren, Generierung in dieser Arbeit beschrieben, MediGene AG, Martinsried
pKS1 – pKS4	Transfervektoren zur Klonierung der Plasmide pKA1 – pKA4, Vektoren zur konstitutiven bzw. induzierbaren Expression in Eukaryonten, Generierung in dieser Arbeit beschrieben, MediGene AG, Martinsried

1.6. Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion, Martinsried, bezogen. Die HPLC-gereinigten Oligonukleotide wurden lyophilisiert und vor der Verwendung auf eine Konzentration von 50 μM mit ddH₂O eingestellt. Die Lagerung der gelösten Oligonukleotide erfolgte bei 4 °C.

Anwendung	Bezeichnung	Sequenz
Primer zur Klonierung der Adenovirusvektoren pKA		
Klonierung der Gateway Kasette, 3 Leseraster	5' Gateway0	5' GCTCTAGAGCAGGGGTACCCCTCCACCATGGGACAATTGGATCAAACAAGTTTGTACAAAAAAG 3'
	5' Gateway1	5' GCTCTAGAGCAGGGGTACCCCTCCACCATGGGACAATTGGATCAAACAAGTTTGTACAAAAAAG 3'
	5' Gateway2	5' GCTCTAGAGCAGGGGTACCCCTCCACCATGGGACAATTGGCTATCAAACAAGTTTGTACAAAAAAG 3'
	3' Gateway	5' GTTCGACTAGTATCATCTAATTAATATCGAACCACTTTGTACAAGAA 3'
Klonierung des YFP-Gens zur Rekombination in pKA, 3 Leseraster		
Klonierung des YFP-Gens zur Rekombination in pKA, 3 Leseraster	5' YFP0	5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGCGTGAGCAAGGGCGAGGAG 3'
	5' YFP1	5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGTGAGCAAGGGCGAGGAG 3'
	5' YFP2	5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGGTGAGCAAGGGCGAGGAG 3'
	3' YFP	5' GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTACTTGTACAGCTCGTCCATGC 3'
Klonierung des induzierbaren Promotors		
Klonierung des induzierbaren Promotors	5' indPro	5' AAGCGAAGATCTTCAAGCGGAGTACTGTCTCTCC 3'
	3' indPro	5' GGGGTACCCCGTGGCCTGTGAAGAGAAAAA 3'
Klonierung des induzierbaren Transkriptionsfaktors		
Klonierung des induzierbaren Transkriptionsfaktors	5' Switch	5' GAAGATCTTCTGCAGGTCGAAGCGGAGTA 3'
	3' Switch	5' CGGGATCCCGCCATAGAGCCACCGCAT 3'
Primer zur Kontrolle der cDNA in pKA		
Primer zur Kontrolle der cDNA in pKA	pGF	5' CTGCTATTCTGCTCAACCT 3'
	CFP rev	5' GCAGGACCATGTGATCGCG 3'
Primer zur Klonierung von Translin		
Primer zur Klonierung von Translin	5' Translin	5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGCTCTGTGAGCGAGATCTTCGT 3'
	3' Translin	5' GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTTTCAACACAAGCTGCTGC 3'
Primer zur Kontrolle der cDNAs (flankiert von attB-Sequenzen)		
Primer zur Kontrolle der cDNAs (flankiert von attB-Sequenzen)	attB1	5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTT 3'
	attB2	5' GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTG 3'
Primer zur Kontrolle von Eingangsklonen (flankiert von attL-Sequenzen)		
Primer zur Kontrolle von Eingangsklonen (flankiert von attL-Sequenzen)	SeqL-A	5' TCGCGTTAACGCTAGCATGGATCTC 3'
	SeqL-B	5' GTAACATCAGAGATTTTGAGACAC 3'

1.7. Chemikalien

Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Bacto-Agar	Difco, Augsburg
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
Ethanol	Riedel-de Haen, Seelze
Ethidiumbromid	Fluka, Buchs Schweiz
Ethylendinitrilotetraessigsäure	Merck, Darmstadt
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Difco, Augsburg
Isopropanol	Riedel-de Haen, Seelze
Methanol	Riedel-de Haen, Seelze
Mowiol (Polyvinylalkohol)	Calbiochem, Bad Soden
Paraformaldehyd	Sigma, Deisenhofen
Sucrose	Sigma, Deisenhofen
Tris	Roth, Karlsruhe
Trypton	Difco, Augsburg
Xylencyanol	Sigma, Deisenhofen
Ficoll 400 (Saccharosepolymer)	Sigma, Deisenhofen
Alle weiteren Chemikalien	Merck, Darmstadt; Roth, Karlsruhe; Sigma, Deisenhofen

1.8. Molekularbiologische und biochemische Reagenzien

Ampicillin	Roche Diagnostics, Mannheim
DNA-Aufreinigungskit aus PCR-Ansätzen, Nr. 51106	Qiagen, Hilden
DNA-Isolationskit aus Agarosegelen, Nr. 28706	Qiagen, Hilden
DNA-Isolationskit für Virus-DNA, Nr. 51183	Qiagen, Hilden
DNA-Längenstandard	Invitrogen, Karlsruhe
DNA-Midipräparationskit, Nr. 12145	Qiagen, Hilden
DNA-Spin-Minipräparationskit, Nr. 27106	Qiagen, Hilden
dNTPs	Qiagen, Hilden
Reagenzien des Gateway-Systems	Invitrogen, Karlsruhe
Kanamycin	Roche Diagnostics, Mannheim
Klenow-Polymerase	Roche Diagnostics, Mannheim
One-Step-RT-PCR, Nr. 210210	Qiagen, Hilden
Restriktionsendonucleasen	Roche Diagnostics, Mannheim
β -Gal-Reporter-Gen-Assay, Nr. 1 758 241	Roche Diagnostics, Mannheim
T4-Ligase	Roche Diagnostics, Mannheim
Taq-PCR-Master-Mix, Nr. 201445	Qiagen, Hilden
Taq-Polymerase	Qiagen, Hilden
TOPO-TA-Klonierungskit	Invitrogen, Karlsruhe
X-Gal Staining Set, Nr. 1828673	Roche Diagnostics, Mannheim

1.9. Reagenzien der Zell- und Viruskultur

Benzonase	Sigma, Deisenhofen
DMEM	Invitrogen, Karlsruhe
Fötale Kälberserum	Biochrom, Berlin
Hepes-Lösung, 1M	Invitrogen, Karlsruhe
H ₂ O, „Zellkulturqualität“	Invitrogen, Karlsruhe
Kollagen I, aus Ratte	Upstate, Lake Placid, NY USA
Leukemia Inhibitory Factor	Sigma, Deisenhofen
L-Glutamin, 200 mM	Invitrogen, Karlsruhe
Lipofectamin 2000	Invitrogen, Karlsruhe
MEM199	Invitrogen, Karlsruhe
Optimem 1	Invitrogen, Karlsruhe
PBS	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin / Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Pferdeserum	Biochrom, Berlin
Phenylephrin, rekombinant	Sigma, Deisenhofen
Pyruvat, 100 mM	Invitrogen, Karlsruhe
Trypanblau, 0,4 %	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin / EDTA	Invitrogen, Karlsruhe

1.10. Material und Geräte der Zell- und Viruskultur

Kryo-Reagenzgefäße, 1,8 ml	Nunc, Wiesbaden
Deckgläschen	Roth, Karlsruhe
Einwegplastikmaterial für Zellkultur	BD Biosciences, Heidelberg; Greiner, Frickenhausen; Corning, Bodenheim; Braun, Melsungen
Inkubatoren	Eppendorf, Hamburg
Kammerobjektträger Nr. 177410	Heraeus, Hanau; Sanyo, Bad Nenndorf
Kühlzentrifuge, 3K-15	Nunc, Wiesbaden
Mikroskop, Axiovert 25	Sigma, Osterode
Multiwellplatten	Zeiss, Jena
NAP 25 Säule, Sephadex	BD Biosciences, Heidelberg; Greiner, Frickenhausen
Objektträger	Amersham Pharmacia, Freiburg
Pipetten	Marienfeld, Laude-Königshofen
Pipettenspitzen mit Filterstopfen	Corning, Bodenheim
Sterilbank	Rainin, Leiden Niederlande
Zählkammer	BDK, Sonnenbühl
Zellkulturflaschen	Hycor Biomedical, Kassel
Zellsieb, 70 µm, Nylon	Greiner, Frickenhausen
Zentrifuge, 3-15	BD Biosciences, Heidelberg
	Sigma, Osterode

1.11. Allgemeines Labormaterial und Geräte

Bakterienschüttler, Certomat R	Braun, Melsungen
Brutschränke für Prokaryonten	Heraeus, Hanau
Digitalkamera, Spot Insight Color	Visitron Systems, Puchheim
DNA-Kapillarsequenziergerät, ABI Prism 310	Applied Biosystems, Weiterstadt
Einwegplastikmaterial	Greiner, Frickenhausen; BD Biosciences, Heidelberg; Nunc, Wiesbaden; Eppendorf, Hamburg
Elektroporationsgerät, Gene Pulser	Bio Rad, München
Elektroporationsküvetten, 2 mm	Eurogentec, Seraing Belgien
Fluoreszenzmikroskop, Axiovert S100	Zeiss, Jena
Geldokumentationssystem, Eagle Eye II	Stratagene, Amsterdam Niederlande
Gelelektrophoresekammern	Invitrogen, Karlsruhe
Glaswaren	Schott, Mainz
Kühlzentrifuge Rotanta	Hettich, Tuttlingen
Kühlzentrifuge Sorvall RC 5B plus	DuPont, Bad Homburg
Laser Scanning Cytometer	CompuCyte, Boston, MA USA
Luminometer, Lumat LB 9501	Berthold, Bad Wildbad
PCR-Thermocycler, MultiCycler PTC 225	Biozym, Hessisch Oldendorf
Pipetten, Einkanal, Mehrkanal	Eppendorf, Hamburg
Spektralphotometer, Ultraspec 2000	Amersham Pharmacia, Freiburg
Tischzentrifuge 5417C	Eppendorf, Hamburg
Vakuumtrockner, Speedvac	Bachofer, Reutlingen

2. Methoden

2.1. Molekularbiologische Methoden

Die im Folgenden aufgeführten Präparationen und Inkubationen von rekombinanten Prokaryonten wurden im Laborraum, Sicherheitsstufe S1 durchgeführt. Alle Medien, Flüssigkeiten, Kulturgefäße und Arbeitsmaterialien wurden steril eingesetzt.

2.1.1. Präparation von Plasmid-DNA

Minipräparation

Die Minipräparation diente der Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* in kleinem Maßstab. Die Methode beruhte auf der selektiven Renaturierung transformierter Plasmide nach alkalischer Lyse.

2 ml einer Übernachtskultur transformierter *E. coli* wurden bei 10.000 x g für 1 min abzentrifugiert. Das Sediment (Pellet) wurde in 300 µl Puffer P1 resuspendiert und zur alkalischen Lyse mit 300 µl Puffer P2 vermischt. Die Reaktion wurde nach 3 min mit 300 µl Puffer P3 abgestoppt. Die Suspension wurde 5 min auf Eis gelagert und anschließend bei 10.000 x g für 10 min zentrifugiert. Der plasmidhaltige Überstand wurde zum Fällen der DNA mit 500 µl 2-Propanol versetzt und 10 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Das DNA-Präzipitat wurde mit 300 µl Ethanol gewaschen, 5 min bei 10.000 x g zentrifugiert und vakuumgetrocknet. Die DNA wurde anschließend in 50 µl ddH₂O gelöst.

Puffer P1:

RNase A	100 mg/ml
Tris, pH 8,0	50 mM
EDTA	10 mM

Puffer P2:

NaOH	200 mM
SDS	1 %

Puffer P3: Kaliumacetat 2,5 M

Midipräparation

Die DNA-Reinigungsmethode beruhte auf einem Anionen-Austauscher-Harz, mit welchem DNA spezifisch gebunden und nach Aufreinigung bei erhöhtem pH-Wert eluiert wurde. Die eingesetzten Qiagen Midi-Preps (Tip-100 Säulen) ermöglichten eine DNA-Ausbeute bis 500 µg. Es wurden 100 ml einer Übernachtskultur transformierter *E. coli* verwendet.

Die Bakterien wurden 5 min bei 5.000 x g sedimentiert und in 4 ml Puffer P1 resuspendiert. 4ml Puffer P2 wurden zugegeben und 5 min bei RT inkubiert. Zum Beenden der Lysis-Reaktion wurden 4 ml Puffer P3 zugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurde die Lösung 30 min bei 20.000 x g, 4°C zentrifugiert. Die Tip-100 Säulen wurden mit 4 ml Puffer QBT äquilibriert. Der Überstand des Zentrifugationsschritts wurde auf die Säule gegeben und diese anschließend zweimal mit 10 ml Puffer QC gewaschen. Die gebundene DNA wurde schließlich mit 5 ml Puffer QF (RT bei kleinen Plasmiden, 50 °C bei Plasmiden > 10 Kb) eluiert. Die DNA wurde mit 0,7 Volumina 2-Propanol gefällt und 90 min bei 4600 x g, 4°C zentrifugiert. Die Plasmid-DNA wurde mit 70 % EtOH gewaschen, vakuumgetrocknet und in 300 µl ddH₂O aufgenommen

Puffer P1:

RNase A	100 mg/ml
Tris, pH 8,0	50 mM
EDTA	10 mM

Puffer P2:

NaOH	200 mM
SDS	1 %
Puffer P3:	Kaliumacetat 2,5 M

Puffer QBT:

NaCl	750 mM
MOPS, pH 7,0	50 mM
Triton X-100	0,15 %
EtOH	15 %

Puffer QC:

NaCl	1 M
MOPS, pH 7,5	50 mM
EtOH	15 %

Puffer QF:

NaCl	1,25 M
MOPS, pH 8,2	50 mM
EtOH	15 %

2.1.2. Analyse von Plasmid-DNA

Absorptionsspektrometrie

Konzentration und Reinheit von DNA-Lösungen wurden im Spektralphotometer bestimmt. Es wurden 100 µl einer 1:50 Verdünnung der Plasmidlösung in einer Quartz-Küvette vermessen. Die Absorption bei 260 nm zeigte die Konzentration von Nukleinsäure an, die Absorption bei 280 nm war vor allem auf Verunreinigungen mit Proteinen (Tyrosin, Tryptophan) zurückzuführen. Eine OD₂₆₀ von 1 entsprach 50 µg/ml dsDNA (bzw. 33 µg/ml ssDNA oder 44 µg/ml RNA). Der Quotient der Absorptionskoeffizienten A₂₆₀/A₂₈₀ definierte die Reinheit der DNA (A₂₆₀/A₂₈₀ für reine DNA = 2). Der Quotient A₂₆₀/A₂₈₀ lag im allgemeinen bei 1,8.

Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA im elektrischen Feld diente der:

- Größenbestimmung von DNA-Fragmenten
- Abschätzung der DNA-Konzentration
- Bestimmung des Restriktionsmusters einer DNA nach enzymatischer Spaltung

Die DNA-Banden wurden nach Interkalation von Ethidiumbromid bei 265 nm detektiert. Alle Auftrennungen erfolgten über Horizontalgele. Entsprechend der DNA-Größe wurden Agarosekonzentrationen von 0,8 – 2,0 % verwendet.

Hierzu wurde Agarose in 1 x TBE durch Erhitzen gelöst, nach Abkühlen unter 50 °C mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in einen entsprechenden Gelschlitten gegossen. Der Gellauf der DNA-Probe in 6 x Probenpuffer erfolgte in einer Flachgelapparatur mit 1 x TBE-Laufpuffer bei 100 Volt/cm. Als Referenz wurde stets ein Längenstandard aufgetragen. Die Gele wurden anschließend mittels Videokamera und Photoprinter (Eagle Eye II) dokumentiert.

6 x DNA-Probenpuffer:

Bromphenolblau	0,25 %
Xylencyanol	0,25 %
Ficoll 400	15 %

10 x TBE:

TRIS	890 mM
Borsäure	890 mM
EDTA	10 mM

DNA-Sequenzanalyse

Nicht-radioaktive Sequenzreaktionen wurden nach der Dideoxy-Kettenabbruchmethode nach Sanger durchgeführt. Die fluoreszenzmarkierten PCR-Produkte wurden durch Kapillarelektrophorese aufgetrennt und mittels Laser-Fluoreszenzdetektion (Abi Prism 310 Genetic Analyzer) analysiert.

2.1.3. Aufreinigung von DNA

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Reaktionsansätzen und Gelpräparationen wurden Silika-Gel-Membranen der Firma Qiagen eingesetzt, die in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen und $\text{pH} < 7,5$ effizient DNA binden. Die Elution gereinigter DNA erfolgte mit ddH₂O.

Aufreinigung von DNA aus Lösungen

Da DNA nach Enzymreaktionen mit Primern, Salzen, Nukleotiden und Enzym verunreinigt war, wurde ein Reinigungsschritt über QIAquick-Spin-Säulen vorgenommen:

5 Volumina Puffer PB wurde mit 1 Volumen PCR-Ansatz vermischt und auf eine Säule gegeben. Die Lösung wurde abzentrifugiert (1 min, 10.000 x g), wobei die DNA an die Membran gebunden wurde. Im Waschschrift wurden 0,75 ml Puffer PE zugesetzt und wie zuvor abzentrifugiert. Die gereinigte DNA wurde anschließend in 40 µl ddH₂O eluiert (1 min, 10.000 x g).

Puffer PB, PE:

Qiagen-Kit Nr. 28104

Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Um DNA aus Agarosegelen aufzureinigen, wurden QIAquick-Spin-Säulen verwendet. Das ausgeschnittene DNA-Fragment wurde in der dreifachen Masse Puffer QG bei 50 °C schüttelnd gelöst. Die DNA-Lösung wurde auf eine Säule gegeben und abzentrifugiert (1 min, 10.000 x g). Die gebundene DNA wurde in 0,75 ml Puffer PE gewaschen (1 min, 10.000 x g) und in 20 µl ddH₂O eluiert.

Puffer QG:

Qiagen-Kit Nr. 28104

Puffer PE:

Qiagen-Kit Nr. 28104

2.1.4. Modifizierung rekombinanter DNA

Restriktionsspaltung

Um Vektoren zu linearisieren oder Fragmente aus ihnen zu isolieren, wurde DNA mit 1-5 U Restriktionsendonuclease pro 1 µg DNA im vom Hersteller angegebenen Puffer selektiv gespalten. Der Ansatz wurde bei optimaler Temperatur zwei Stunden inkubiert. Zur partiellen Restriktionshydrolyse wurden die Reaktionsansätze nach kürzeren Inkubationszeiten abgestoppt. Die mit 6 x DNA-Probenpuffer versetzten Restriktionsfragmente wurden auf einem Agarosegel analysiert.

DNA Ligation

Mithilfe der T4-Ligase wurde die freie 5'-Phosphatgruppe der zu insertierenden DNA mit der freien 3'-Hydroxylgruppe des Vektors unter Ausbildung einer Phosphodiesterbindung ligiert. 50 - 200 ng des linearisierten Vektors wurden mit dem dreifachen molaren Überschuß des zu ligierenden Inserts mit 1-20 U T4-Ligase bei RT für 3 h inkubiert. 5 µl des Ligationsansatzes (Gesamtvolumen: 10 µl) wurden zur Transformation von *E. coli* eingesetzt (siehe „Methoden 2.1.5.“).

10 x Ligasepuffer:

NaCl	50 mM
Tris / HCl, pH 7,9	10 mM
MgCl ₂	10 mM
DTT	1 mM

Auffüllreaktion 5`-überhängender DNA Enden

Die 5`-3`-Polymeraseaktivität wurde zum Auffüllen freier 5`-Enden von DNA-Fragmenten oder linearisierten Vektoren genutzt.

1 U Klenow-Polymerase pro 2 µg DNA wurden nach Herstellerangaben 1 h bei RT inkubiert.

Die DNA wurde anschließend wie in „Methoden 2.1.3.“ beschrieben aufgereinigt.

Klenow-Puffer 10 x:

Tris / HCl, pH 7,5	700 mM
MgCl ₂	100 Mm
DTT	10 mM
dNTPs	250 µM

Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

PCR Methoden wurden eingesetzt um DNA-Fragmente zwischen zwei Primern zu amplifizieren. Die Reaktionen dienten der Isolierung von DNA-Klonen aus cDNA-Banken sowie der Amplifikation und Mutation von DNA zur Klonierung von Vektoren und kodierenden Sequenzen.

Reaktionsansatz, auf Eis pipettiert:

Template-DNA	100 ng
Primerpaar	50 pm je Primer
PCR Master-Mix	30 µl
ddH ₂ O	ad 60 µl

PCR Master-Mix (Qiagen)

MgCl ₂	3 mM
dNTPs	400 µM je dNTP
Taq-Polymerase	1,5 U
ddH ₂ O	ad 30µl

Standard PCR-Programm:

94 °C	5 min	

94 °C	1 min	} 20 x Amplifikationszyklus
T _{anneal}	1 min	
72 °C	1 min pro 1Kb DNA-Sequenz	

72 °C	5 min	
4 °C	∞	

Die optimale Annealing-Temperatur der Primer wurde wie folgt berechnet:

$$T_{\text{anneal}} [^{\circ}\text{C}] = [\Sigma(\text{A} \cup \text{T}) \times 2 ^{\circ}\text{C} + \Sigma(\text{G} \cup \text{C}) \times 4 ^{\circ}\text{C}] - 5 ^{\circ}\text{C}$$

Die Annealing-Temperatur wurde für die zur Template-DNA komplementären Primerbereiche berechnet.

Wurden über den Primer zusätzliche Nukleotide an die Matrix-DNA angefügt, so wurde ein zweiter Amplifikationsschritt (20 Zyklen) mit der für die Gesamtlänge des Primers berechneten Annealing-Temperatur eingefügt. Der erste Amplifikationsschritt wurde in diesem Fall von 20 auf 10 Zyklen verringert. Die amplifizierten PCR-Fragmente wurden gel- oder säulengereinigt (siehe „Methoden 2.1.3.“) und anschließend bei -20 °C gelagert.

RT-PCR

Zur Amplifikation von Genen aus RNA-Banken wurde die One-Step-RT-PCR (Qiagen) eingesetzt.

Reaktionsansatz, auf Eis präpariert:

5 x Puffer	10 µl
dNTPs (10 mM pro dNTP)	2 µl
Primerpaar	0,6 µM pro Primer
RT-PCR-Enzym-Mix	2 µl
RNA	1 µg
ddH ₂ O, RNase frei	ad 50 µl

Die reverse Transkription der RNA wurde bei 50 °C, 30 min in einem Thermocycler durchgeführt. Bei dieser Temperatur wurden Sekundärstrukturen der RNA zerstört. Durch nachfolgendes Erhitzen auf 95 °C für 15 min wurde die reverse Transkriptase inaktiviert und

gleichzeitig die HotStar-DNA-Polymerase aktiviert. Die anschließende DNA-Amplifikation wurde nach folgendem Programm durchgeführt:

PCR-Programm

94 °C	1 min	} 30 x Amplifikationszyklus
T _{anneal}	1 min	
72 °C	1 min pro 1Kb DNA-Sequenz	

72 °C	5 min	
4 °C	∞	

Das PCR-Produkt wurde wie unter „Methoden 2.1.3.“ beschrieben aufgereinigt.

2.1.5. Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA

Zur Amplifikation von Plasmid-DNA wurden kompetente *E. coli* mit Plasmiden transformiert. Die gesamte Methode wurde auf Eis durchgeführt. 20 µl elektrokompente *E. coli* Suspension wurden mit DNA (50 ng Plasmid-DNA, 2 µl Ligationsansatz bzw. 2 µl Gateway-Rekombinationsansatz) gemischt und mit ddH₂O auf 30 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde in eine 2 mm-Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation wurde bei 2 kV, 100 Ω, 25 µF durchgeführt. Die Zellen wurden anschliessend 1 h bei 37 °C in 1 ml SOC Medium unter Schütteln inkubiert. 100 µl des Transformationsansatzes wurden auf einer LB-Platte mit entsprechendem Selektions-Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Von der Platte wurden Einzelkolonien in 2 ml-Flüssigkulturen (LB + Selektionsantibiotikum) angesetzt und die Plasmid-DNA isoliert.

SOC Medium, pH 7,5:

Trypton	2 %
Hefeextrakt	0,5 %
NaCl	0,05 %
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10 mM
Glucose	20 mM

Agarplatten:

Hefeextrakt	10 g/l
Trypton	5 g/l
NaCl	5 g/l
Agar	15 g/l

2.1.6. *In vitro* Rekombination (Gateway-System, Invitrogen)

Im Vergleich zur herkömmlichen Klonierung mittels Restriktionsenzymen und Ligasen wurden beim Gateway-System DNA-Sequenzen durch homologe Rekombination in Vektoren integriert. Die Reaktion basierte auf dem sequenzspezifischen Integrations- / Exzisionssystem des Bakteriophagen λ .

Zur Integration eines Gens (PCR-Produkt, cDNA) wurden die flankierenden Sequenzen attB1 (5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGC 3') und attB2 (5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC 3') durch PCR angefügt. Dieser so genannte Expressionsklon wurde in einer Rekombinationsreaktion mit attP-Bereichen des Donorvektors in einen Eingangsklon integriert.

In einem nachfolgenden Reaktionsschritt wurde das Gen mit den flankierenden attL-Bereichen aus dem Eingangsvektor in der LR-Reaktion in das geforderte Expressionsvektorsystem (rekombinantes Adenovirus oder pShuttle-Vektor mit attR-Rekombinationskassette) integriert.

Reaktionsansatz BP-Rekombination:

BP-Klonase-Reaktionspuffer	2 μ l
BP-Klonase-Enzymmix	2 μ l
attB-PCR-Produkt	50 ng
Donorvektor pDONR 212	150 ng
TE	ad 10 μ l

Der Rekombinationsansatz wurde > 2 h bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 4 μ g Proteinase K und Inkubation bei 37 °C für 10 min abgestoppt. 2 μ l des Ansatzes wurden zur Transformation von *E. coli* eingesetzt (siehe „Methoden 2.1.5.“). Der in *E. coli* amplifizierte Eingangsvektor wurde isoliert (siehe „Methoden 2.1.1.“) und mit Restriktions- und Sequenzanalyse überprüft. Der aufgereinigte Vektor wurde anschließend in der LR-Reaktion verwendet.

Reaktionsansatz LR-Rekombination:

LR-Klonase-Reaktionspuffer	2 μ l
LR-Klonase-Enzymmix	2 μ l
Eingangsvektor	300 ng
Expressionsvektor pShuttle	300 ng
oder	
adenoviraler Expressionsvektor	1000 ng
TE	ad 10 μ l

Der Reaktionsansatz wurde wie bei BP-Reaktion beschrieben behandelt. Eine simultane Rekombination mehrerer Eingangsklone mit einem Expressionsvektor wurde hingegen über Nacht bei 25 °C inkubiert. Der gereinigte Vektor wurde später zur Genexpression in Eukaryonten eingesetzt. Die LR- bzw. BP-Rekombinationsreaktionen werden in den Abbildungen 6 und 7 schematisch dargestellt.

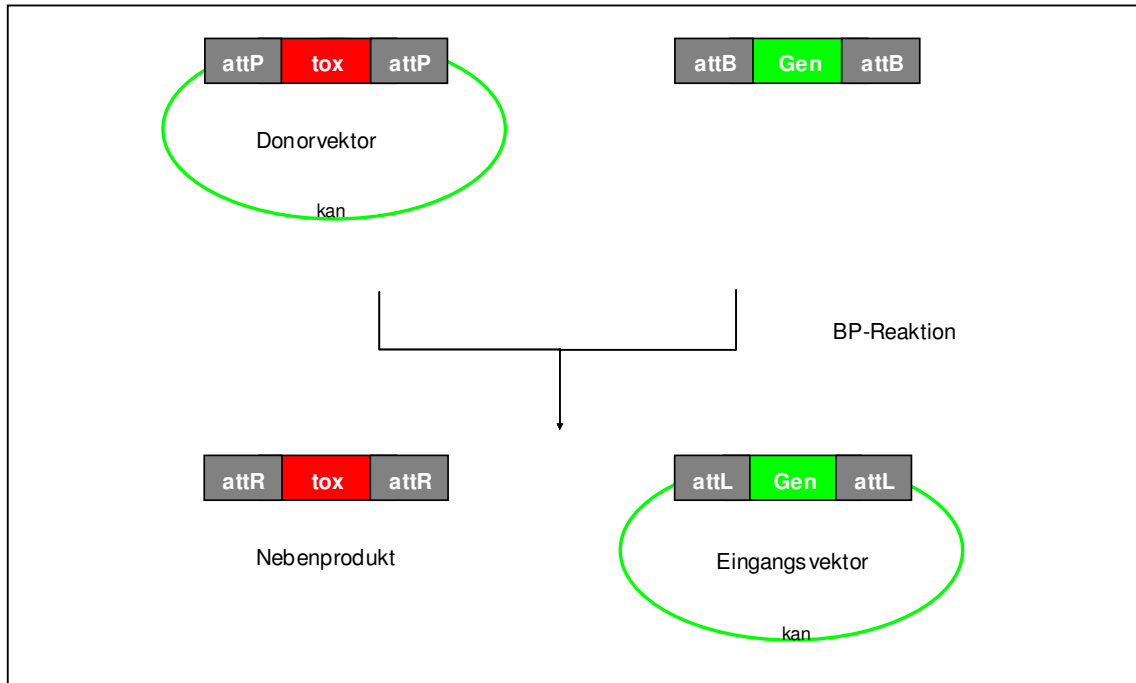


Abbildung 6: BP-Rekombinationsreaktion (Gateway-System, Invitrogen)

Die DNA-Sequenz einer PCR-Reaktion oder cDNA-Bibliothek wurde mittels spezifischer Rekombination in einen universellen Eingangsvektor integriert. Nach erfolgter Rekombination und Selektion wurde der Eingangsvektor als Transfersystem zur Integration der DNA-Sequenz in verschiedene Expressionsvektoren genutzt.

- attB, attP: homologe DNA-Sequenzen aus *E. coli* (attB) bzw. Bakteriophage λ (attP) zur *in vitro* Rekombination von Donorvektor und zu integrierendem Nukleinsäurefragment
- attL, attR: homologe DNA-Sequenzen der Reaktionsprodukte der BP-Rekombination
- tox: toxischer Selektionsmarker (Inhibition der Gyrase in *E. coli* DH5 α)
- kan: Kanamycin-Resistenzkassette, Selektionsmarker

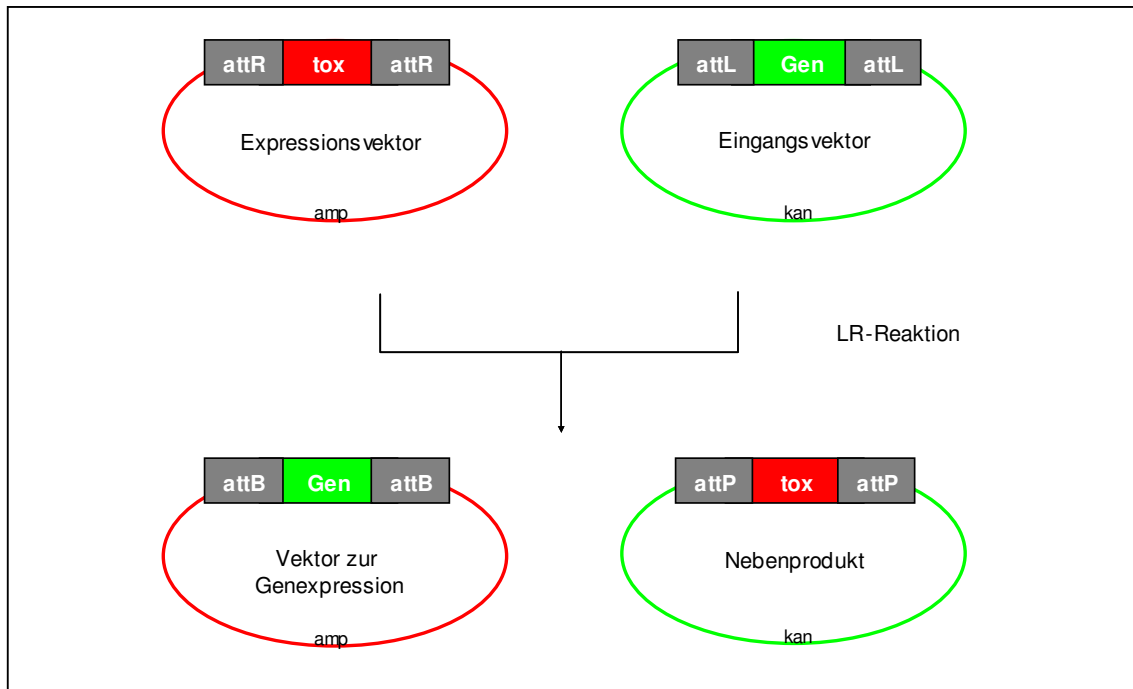


Abbildung 7: LR-Rekombinationsreaktion (Gateway-System, Invitrogen)

Die DNA-Sequenz des Eingangsvektors wurde durch spezifische Rekombination in ein Expressionsplasmid integriert. Nach erfolgter Rekombination und Selektion wurde der Vektor zur Expression und funktionellen Analyse der rekombinanten DNA-Sequenz eingesetzt.

- attL, attR: homologe DNA-Sequenzen zur *in vitro* Rekombination von Expressionsvektor und zu integrierendem Nukleinsäurefragment des Eingangsvektors
- attB, attP: homologe DNA-Sequenzen aus *E. coli* (attB) bzw. Bakteriophage λ (attP) zur *in vitro* Rekombination, hier als Reaktionsprodukt aus der LR-Rekombination hervorgegangen
- tox: toxischer Selektionsmarker (Inhibition der Gyrase in *E. coli* DH5 α)
- kan: Kanamycin-Resistenzkassette, Selektionsmarker
- amp: Ampicillin-Resistenzkassette, Selektionsmarker

2.1.7. Generierung rekombinanter Adenovirusgenome (AdEasy-System, Qbiogene)

Zur Herstellung der rekombinanten Adenoviren pKA (siehe „Ergebnisse 1.1.“) wurde unter anderem die Technologie des AdEasy-Systems verwendet. In diesem zweistufigen Prozess wurde zunächst die erforderliche Expressionskassette in einen Transfervektor integriert. Im zweiten Schritt wurde die Kassette durch homologe Rekombination in *E. coli* BJ5183 in das Adenovirusgenom eingefügt:

Mittels Standardmethoden der Molekularbiologie (enzymatische Restriktion, Ligation) wurde eine Expressionskassette in die BglII/BamHI-Klonierungsstelle des pShuttle-Transferplasmids inseriert. 1 µg des kanamycinresistenten Transfervektors wurde mit Pme I linearisiert und mit 100 ng des Plasmids der viralen DNA (pAdEasy-1) zur Kotransformation von 40 µl *E. coli* BJ5183 eingesetzt. Die Transformation wurde bei 2 kV, 100 Ω, 25 µF in einer 2 mm Elektroporationsküvette durchgeführt. Nach homologer Rekombination in den recA-positiven *E. coli* wurden die Zellen 1 h in 1 ml LB-Medium bei 37 °C schüttelnd inkubiert. 300 µl des Ansatzes wurden auf LB-Platten (50 µg/ml Kanamycin) ausplattiert. Kleine Kolonien wurden nach 18 h zur Mini-Präparation isoliert. Die Plasmid-DNA wurde anschließend mit Pac I geschnitten. Positive Klone zeigten auf dem Agarosegel eine 30 Kb Bande des linearen AV Genoms sowie eine 3 bzw. 4,5 Kb Bande des rekombinierten Transfervektors. Die Klone wurden anschließend in *E. coli* DH10B amplifiziert. Das Prinzip der Generierung rekombinanter Adenovirusgenome wird in Abbildung 8 dargestellt.

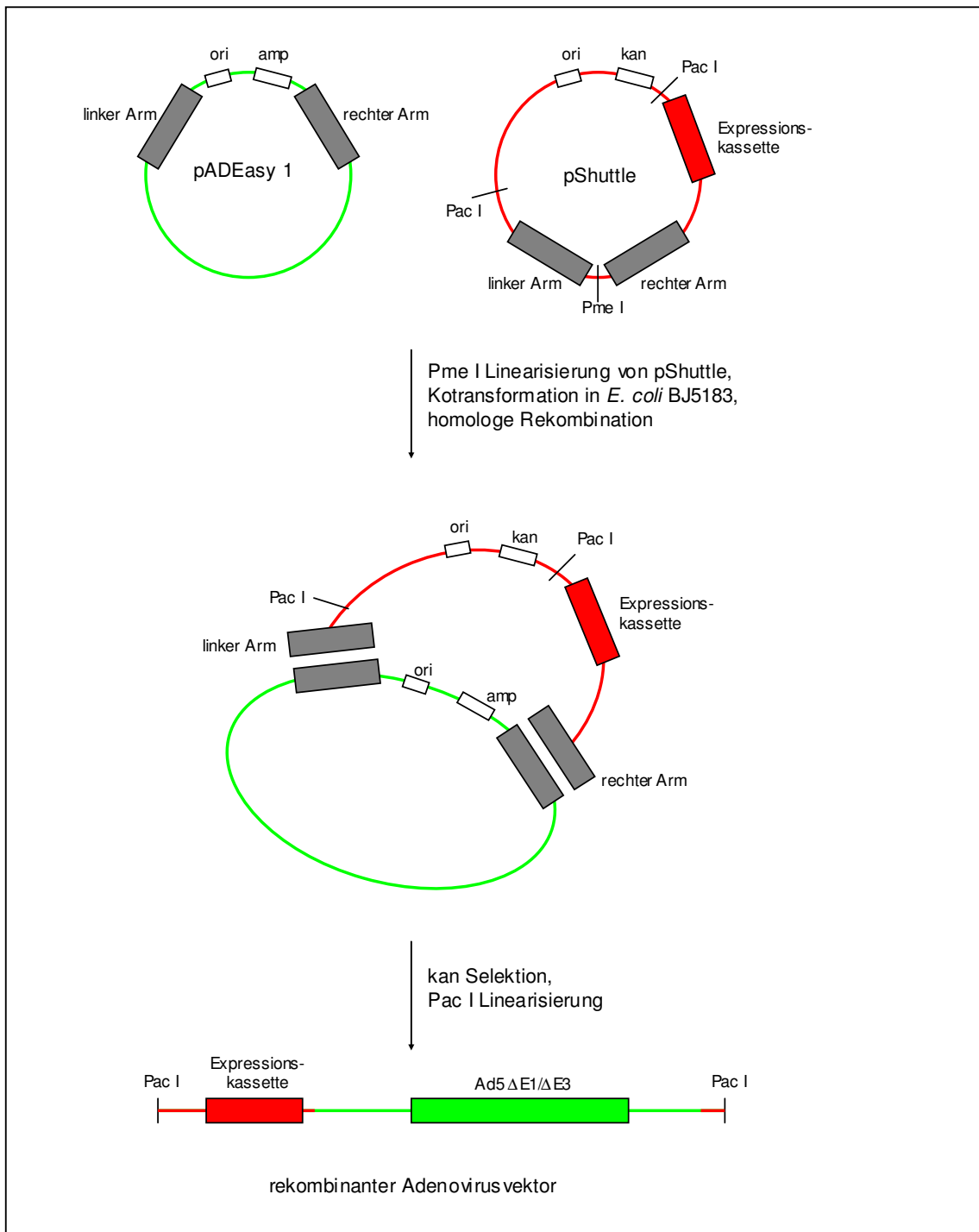


Abbildung 8: Generierung rekombinanter Adenovirusgenome (AdEasy-System, Qbiogene)

Die Herstellung des rekombinanten Adenovirusgenoms wurde in einem zweistufigen Prozess durchgeführt, in dem die erforderliche Expressionskassette zunächst in einen pShuttle Transfervektor integriert wurde. Darauf folgend wurde die Kassette durch homologe Rekombination in das Adenovirusgenom des Plasmids pAdEasy1 inseriert. Nach Selektion und Linearisierung wurde der rekombinante Adenovirusvektor zur Verpackung in HEK293 Zellen eingesetzt.

2.1.8. Induzierbares Expressionssystem (Gene-Switch, Invitrogen)

Zur regulierbaren Genexpression in Säugerzellen wurde das Gene-Switch System (Invitrogen) verwendet. Das System setzt sich aus drei Komponenten zusammen:

- Plasmid pGene zur induzierbaren Expression rekombinanter Proteine unter der Kontrolle eines Hybridpromotors (GAL4 Upstream Activating Sequences (UAS) und Adenovirus E1b TATA Box)
- Plasmid pSwitch zur Expression eines chimären Transkriptionsfaktors bestehend aus der GAL4 DNA Bindedomäne (DBD), einer trunkierten, humanen Progesteronrezeptorbindedomäne (PRB) sowie der humanen p65 Aktivierungsdomäne (TAD). Die Expression des Fusionsproteins unterliegt der Kontrolle eines Hybridpromotors bestehend aus Gal4 UAS und dem Minimalpromotor einer viralen Thymidinkinase (TK).
- Antiprogesteron Mifepriston (RU 486)

Zur induzierbaren Expression wurden eukaryontische Zellen entweder mit den Plasmiden pGene und pSwitch transfiziert oder mit rekombinanten Adenoviren infiziert, in welche die beiden Komponenten des Gene-Switch-Systems integriert worden waren (AV pKA3, AV pKA4).

In Abwesenheit von Mifepriston wurde aufgrund der basalen Promotoraktivität des TK-Promotors der Transkriptionsfaktor schwach exprimiert. Mifepriston band nach seiner Zugabe spezifisch an die Progesteronrezeptorbindedomäne und überführte den Transkriptionsfaktor nach Konformationsänderung und Dimerisierung in seine aktive Form. Homodimere des Transkriptionsfaktors aktivierten dann nach Bindung an die GAL4 UAS sowohl die Transkription des rekombinanten Gens als auch des Transkriptionsfaktors selbst. Die Expression des Gens wurde somit durch die Autoamplifikation des Transkriptionsfaktors verstärkt. Die nachfolgende Abbildung 9 zeigt das Funktionsschema des regulierbaren Expressionssystems.

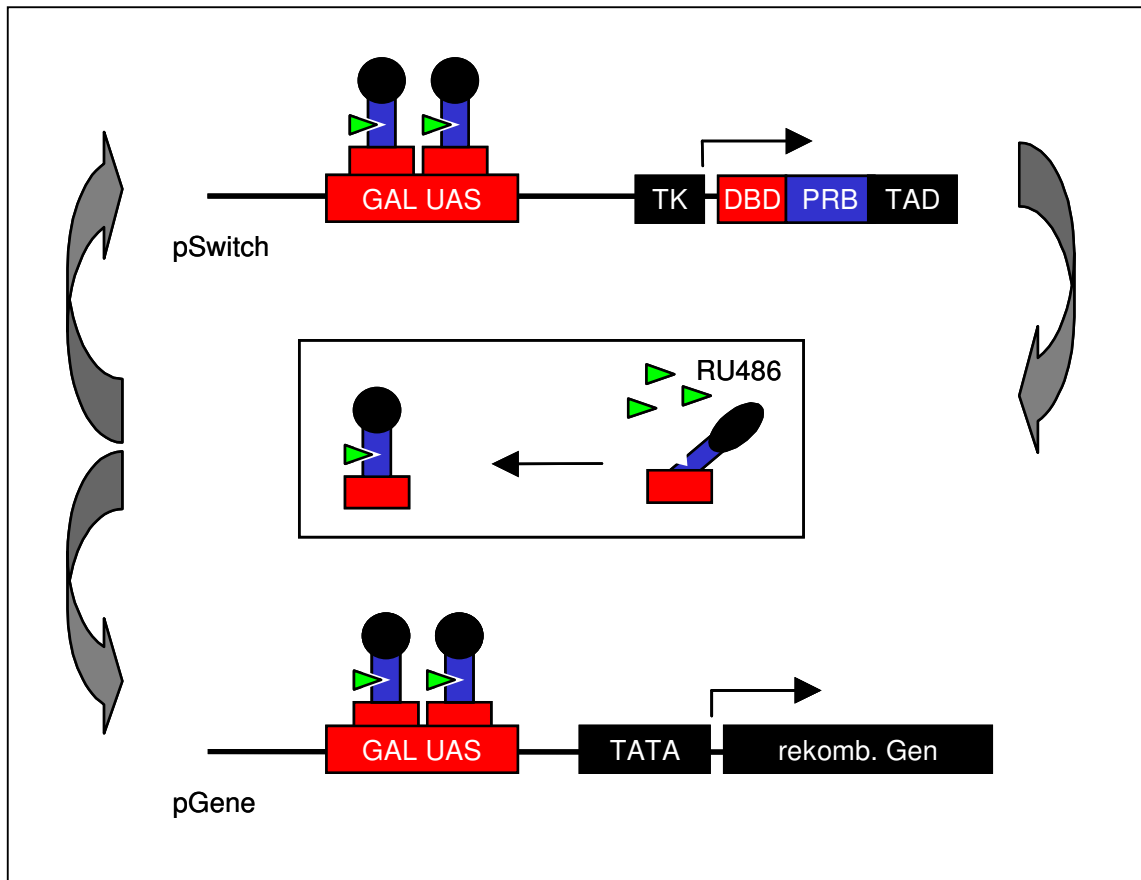


Abbildung 9: Schema des induzierbaren Expressionssystems (Gene-Switch, Invitrogen)

Auf Grund der basalen Aktivität des Thymidinkinase-Promotors (TK) fand eine schwache Expression des inaktiven Transkriptionsfaktors statt. Nach Aktivierung des Transkriptionsfaktors durch das Antiprogesteron RU486 wurde die Expression des rekombinanten Gens und des Transkriptionsfaktors selbst induziert.

GAL UAS:	GAL4-Transkriptionsaktivierungsdomäne
TK:	viraler Thymidinkinase-Promotor
DBD:	DNA-Bindungsdomäne
TAD:	Transaktivierungsdomäne
RU486:	Mifepriston (Antiprogesteron)
TATA:	adenoviraler E1b Minimalpromotor
pSwitch:	Plasmid zur Expression des Transkriptionsfaktors
pGene:	Plasmid zur Expression des rekombinanten Gens

2.2. Methoden der Zellkultur

Die biologischen Arbeiten wurden im Labor der Sicherheitsstufe 1 unter Laminarluftfluss durchgeführt. Sämtliche Medien, Flüssigkeiten, Kulturgefäße und Arbeitsmaterialien wurden steril eingesetzt.

2.2.1. HeLa, HEK Erhaltungskultur

Die adhärenenten Zelllinien HeLa und HEK 293 wurden als Einschichtkultur in Zellkulturflaschen (Bodenfläche 25 cm², 75 cm² oder 175 cm²) kultiviert. Die Zellen wurden im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und H₂O-gesättigter Atmosphäre vermehrt. Bei einer Zelldichte > 75 % Konfluenz wurden die Zellen im Verhältnis 1:8 gesplittet: Die Zellen wurden hierfür einmal mit PBS (RT) gewaschen und durch Inkubation mit Trypsin/EDTA (0,05 % w/v Trypsin, 0,02 % w/v EDTA) abgelöst. Die Zellsuspension wurde mit D10 Medium auf das zweifache Volumen aufgefüllt und 5 min bei RT, 45 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in frischem D10 Medium resuspendiert. Die Zellen wurden zur weiteren Kultivierung in Zellkulturflaschen überführt.

D10 Medium:

DMEM	500 ml
FCS	10 %
Pyruvat	1 mM
Glutamin	2 mM
Streptomycin	50.000 U
Penicillin	50.000 U

PBS, pH 7,2:

NaCl	155 mM
KH ₂ PO ₄	1,5 mM
Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O	2,7 mM

2.2.2. Transiente Transfektion von HeLa Zellen

Einen Tag vor der Transfektion wurden 1 x 10⁵ HeLa Zellen pro 10 cm² Kulturfläche einer Multiwellplatte ausplattiert.

Am nächsten Tag wurde ein Präzipitat aus DNA und Calciumphosphatkristallen hergestellt: 3 µg Plasmid-DNA wurden in 72 µl H₂O gelöst, 8 µl 2,5 M CaCl₂ wurden zugegeben und die

Lösung kurz gemischt. Danach wurden 80 µl 2 x BBS-Puffer zugefügt, der Ansatz erneut gemischt und 30 min bei RT inkubiert.

Die HeLa Zellkultur wurde mit frischem D10 Medium versetzt. Anschließend wurde das Präzipitat auf die Zellen pipettiert und der Ansatz 20 h im Brutschrank bei 3 % CO₂, 37 °C inkubiert. Das Präzipitat wurde unter dem Mikroskop begutachtet. Die Zellen wurden danach zweimal mit PBS gewaschen und frisches D10 Medium zugefügt. Die Analyse der Zellen erfolgte 48 h nach der Transfektion im Fluoreszenzmikroskop.

2 x BBS-Puffer, pH 6,95

NaCl	280 mM
BES	50 nM
Na ₂ HPO ₄	0,75 mM
NaH ₂ PO ₄	0,75 mM

2.2.3. Isolierung primärer Kardiomyozyten

Zur herzzellspezifischen, rekombinanten Expressionsanalyse wurden Kardiomyozyten neonataler Ratten verwendet.

Nach zervikaler Dislokation (Luxation der Halswirbelsäule durch schnelles Strecken) wurden 30 Ratten (Alter 2 – 3 Tage) die Herzventrikel entnommen. Die Organe wurden dreimal in 40 ml VIP-Puffer bei 4 °C gewaschen und in eine Petrischale auf Eis überführt. Hier wurden die Herzen mit einer Schere in 0,5 – 1 mm³ große Stücke mechanisch zerkleinert. Anschließend erfolgte eine enzymatische Zellvereinzelnung. Hierbei wurde das Herzgewebe insgesamt viermal 40 min bei 37°C, 100 rpm in frischer Kollagenaselösung (7,5 mg Kollagenase + 15 ml VIP-Puffer) in einem 100 ml-Erlenmeyerkolben inkubiert. Der erythrozytenhaltige Überstand des ersten Kollagenaseverdaus wurde verworfen. Die Überstände der zweiten und dritten sowie die gesamte Zellsuspension nach der vierten Kollagenasebehandlung wurden über einen Cell Strainer in 50 ml Falcon Röhren filtriert. Die Zellen wurden in insgesamt 70 ml VIP-Puffer (RT) suspendiert und in einer Zellkulturflasche (175 cm² Bodenfläche) 2 h bei 37 °C, 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Diese Inkubation diente der Trennung von schnell adhätierenden Fibroblasten und in Suspension verbleibenden Kardiomyozyten. Der Zellüberstand wurde anschließend in zwei 50 ml Falcon Röhren pipettiert und 5 min bei 75 x g abzentrifugiert. Die Zellpellets wurden in 30 ml Plating-Puffer resuspendiert. Zur Quantifizierung der Kardiomyozyten

wurden 50 µl der Zellsuspension mit 200 µl Trypanblau versetzt und die Zellzahl in der Kammer eines Hämocytopeters bestimmt.

VIP-Puffer, pH 7,3:

NaCl	0,1 M
KCl	5 mM
MgSO ₄	0,8 mM
D-Glucose	5,5 mM
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	10 mM
Hepes	20 mM

Plating-Medium:

DMEM	400 ml
M-199	100 ml
Pferdeserum	10 %
Fötale Kälberserum	5 %
Pyruvat	1 mM
Penicillin	50.000 U
Streptomycin	50.000 U

2.2.4. Kultivierung primärer Kardiomyozyten

Primäre Kardiomyozyten wurden in kollagenbeschichteten Kammerobjektträgern kultiviert. Pro 8 cm² Bodenfläche wurden 1 x 10⁵ Zellen in 2,5 ml Plating-Medium ausgesät. Nach 18 h Inkubation bei 37 °C, 5 % CO₂ wurden die Zellen zweimal mit DMEM (37 °C) gewaschen und in 2,5 ml Maintenance-Medium + Phenylephrin (100 µM) weiterkultiviert.

Maintenance-Medium:

DMEM	400 ml
M-199	100 ml
Pyruvat	1 mM
Penicillin	50.000 U
Streptomycin	50.000 U

2.2.5. Kollagenbeschichtung von Objektträgern

Kammerobjektträger aus Kunststoff mit einer Bodenfläche von 8 cm² wurden mit Kollagen Typ I beschichtet. Hierzu wurden die Objektträger 1 h mit 2,5 ml Kollagen-I-Lösung (30 µg/ml in PBS) bedeckt. Die Objektträger wurden anschließend mit PBS (RT) gewaschen und im Luftstrom der Sterilbank getrocknet.

2.3. Methoden der Viruskultur

Die virologischen Arbeiten wurden im Labor der Sicherheitsstufe 2 unter Laminarluftfluss durchgeführt. Sämtliche Medien, Flüssigkeiten, Kulturgefäße und Arbeitsmaterialien wurden steril eingesetzt.

2.3.1. Verpackung rekombinanter Adenoviren

Plasmid-DNA rekombinanter Adenoviren wurde mittels Lipofektion in HEK 293 Zellen transfiziert:

HEK Zellen wurden in einer Kulturflasche (75 cm² Bodenfläche) bis 90 % Konfluenz vermehrt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen in 12 ml Opti-MEM kultiviert.

30 µg der zu transfizierenden DNA wurden mit Pac I linearisiert, in 0,3 M NaAc + 2,5 Vol EtOH präzipitiert und nach Zentrifugation (10.000 x g, 20 min, 4 °C) vakuumgetrocknet. Die DNA wurde in 1,5 ml Opti-MEM in einem 5 ml Polystyrenröhrchen gelöst. 70 µl Lipofectamin wurden in einem zweiten Polystyrenröhrchen mit 1,5 ml Opti-MEM vermischt und 5 min bei RT inkubiert. Die beiden Ansätze wurden gemischt, zur Ausbildung der DNA-Liposomenkomplexe 20 min bei RT inkubiert und anschließend auf die HEK Zellen pipettiert. Nach 16 h Inkubation bei 37 °C, 5 % CO₂ wurde das Opti-MEM Medium gegen 12 ml D2 Medium ausgetauscht. Eine erfolgreiche Lipofektion konnte im Mikroskop anhand der zyan- bzw. gelb-fluoreszierenden Reporterproteine des rekombinanten Adenovirusgenoms detektiert werden.

12 bis 16 Tage nach der Lipofektion begannen sich die HEK Zellen nach Virusverpackung und beginnender Lyse der Zellen abzulösen. Die Zellen wurden dann durch Schwenken der Kulturflasche vollständig abgelöst und für 5 min bei 400 x g und 4 °C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml Sucrose Puffer in Falcon Röhrchen bei – 80 °C gelagert. Die Zellen wurden später wie unter „Methoden 2.3.3.“ beschrieben aufgeschlossen.

D2 Medium:

DMEM	500 ml
FCS	2 %
Pyruvat	1 mM
Glutamin	2 mM
Streptomycin	50.000 U
Penicillin	50.000 U

Sucrose-Puffer, pH 8,0:

Tris	10 mM
MgCl ₂	2 mM
Sucrose	4 %

2.3.2. Amplifikation rekombinanter Adenoviren

Zur Präparation von rekombinanten Adenoviren in einem Maßstab von $\approx 10^9$ infektiösen Partikeln wurde eine Amplifikation in HEK 293 Zellen durchgeführt.

In zwei Kulturflaschen (Bodenfläche 175 cm²) wurden HEK Zellen bis zu einer Konfluenz von 90 % in D10 Medium kultiviert. Die Zellen wurden anschließend in D2 Medium weiterkultiviert und mit 50 % der aus einer Verpackung stammenden Adenovirus suspension (siehe „Methoden 2.3.1.“) infiziert. Der Fortschritt der Amplifikation wurde im Fluoreszenzmikroskop anhand des zytopathischen Effekts der HEK Zellen begutachtet. Hierbei exprimierten infizierte Zellen das zyan-fluoreszierende Reporterprotein, rundeten sich ab und lösten sich schließlich vom Boden der Kulturflasche. Sobald sich > 50 % der Zellen abgelöst hatten, wurden alle Zellen durch Schwenken der Flasche in Suspension gebracht und bei 400 x g, 4 °C abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 1 ml Sucrose-Puffer in ein Falcon-Röhrchen aufgenommen und bei – 80 °C gelagert. Die Zellen wurden später wie unter „Methoden 2.3.3.“ beschrieben aufgeschlossen.

2.3.3. HEK 293 Zellaufschluss

Um rekombinante Adenoviren aus HEK Zellen zu isolieren, wurde die Zellsuspension (siehe „Methoden 2.3.2.“) in drei Zyklen in flüssigem Stickstoff gefroren und im 37 °C Wasserbad aufgetaut. Der Zelldebris wurde bei 400 x g, 5 min, 4 °C abzentrifugiert und der virushaltige Überstand in Kryo-Reagenzgefäßen bei – 80 °C gelagert.

2.3.4. Aufreinigung rekombinanter Adenoviren

Aus HEK Zellen aufgeschlossene Adenoviren (siehe „Methoden 2.3.3.“) wurden über eine Sephadex-Säule nach dem Prinzip der Größenausschlusschromatographie aufgereinigt. Die Säule wurde zunächst mit 24 ml Sucrose Puffer äquilibriert. 1 ml Virussuspension wurde auf die Säule pipettiert. Die Säule wurde mit 2,5 ml Sucrose gewaschen und die Virussuspension

mit weiteren 1,5 ml Puffer eluiert. Die gereinigte Virussuspension wurde im Kryoreagenzgefäß bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.3.5. Titerbestimmung rekombinanter Adenoviren

Der Virustiter wurde nach Infektion von HEK-Zellen anhand der Zyanfluoreszenz des viruskodierten Reporterproteins im Fluoreszenzmikroskop bestimmt.

Hierzu wurden am Vortag 10^4 HEK Zellen pro Vertiefung einer 96-Well-Platte pipettiert (50 μl Zellsuspension pro Vertiefung in D10 Medium). Zur Infektion wurden von der nach „Methoden 2.3.4.“ aufgereinigten Virussuspension halblogarithmische Verdünnungen von $10^{-7} - 10^{-10,5}$ in D2 Medium vorbereitet. Aus jeder Verdünnungsstufe wurden 10 Vertiefungen einer Reihe der Multiwellplatte befüllt (50 μl Virussuspension pro Vertiefung). Nach dreitägiger Inkubation ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2) wurde die 96-Well-Platte im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Anhand der Anzahl der Vertiefungen mit Fluoreszenzsignal in einer Reihe wurde der TCID50-Wert (50 % Tissue-Culture Infectious Doses) des Virus bestimmt. Dieser Wert definiert die Verdünnungsstufe einer Virussuspension, in der mit 50 %iger Wahrscheinlichkeit ein infektiöses Viruspartikel vorhanden ist. Der reziproke TCID50-Wert entspricht dem Virustiter [infektiöse Viruspartikel / Volumen].

$$\text{TCID50} = 10^{(A + 0,25 - 0,05(B + 10))}$$

- A: Exponent der höchsten Verdünnungsstufe, welche Fluoreszenz in allen 10 Vertiefungen einer Reihe der Multiwellplatte verursacht
 B: Summe der Vertiefungen mit Fluoreszenzsignal aus allen Reihen, welche keine Fluoreszenz in allen 10 Vertiefungen einer Reihe zeigen

Virustiter [infektiöse Viruspartikel / Volumen]

$$\begin{aligned} &= \text{TCID50}^{-1} \text{ infektiöse Partikel} / 50\ \mu\text{l} \\ &= 20 \times \text{TCID50}^{-1} \text{ infektiöse Partikel} / 1\ \text{ml} \end{aligned}$$

2.3.6. Aufreinigung adenoviraler DNA

Zur Kontrolle der DNA rekombinanter Adenoviren wurde eine Aufreinigung über Silika-Gel-Membranen (QIAamp DNA Blood mini Kit, Qiagen) mit anschließender PCR durchgeführt.

200 μl gereinigter Adenovirussuspension (siehe „Methoden 2.3.4.“) wurden mit 20 μg Protease in Puffer AL gemischt („vortexen“) und 10 min bei $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ lysiert. Der Ansatz wurde

mit 200 µl EtOH gemischt, zur DNA-Bindung auf eine QIAamp-Säule pipettiert und bei 10.000 x g, 1 min abzentrifugiert. Die Membran wurde mit 500 µl Puffer AW1 (10.000 x g, 1 min) und 500 µl Puffer AW2 (20.000 x g, 3 min) gewaschen. Die DNA wurde mit 50 µl ddH₂O nach 1 min Inkubationszeit eluiert (10.000 x g, 1 min).

Puffer AL, AW1, AW2:

DNA-Isolationskit für Virus DNA, Nr. 51183 (Qiagen, Hilden)

2.4. Analyse der rekombinanten Expression

2.4.1. Adenovirale Infektion primärer Kardiomyozyten

Zur Expression rekombinanter Gene wurden Kardiomyozyten mit Adenoviren infiziert. Die in Maintenance-Medium + Phenylephrin kultivierten Herzzellen wurden mit einer MOI von 10 infiziert, Ausnahmen von dieser Angabe sind im Text vermerkt. Die Zellen wurden nach 48 - 60 h im Fluoreszenzmikroskop betrachtet, eine erfolgreiche Infektion wurde durch Expression der rekombinanten Fluoreszenzproteine angezeigt.

2.4.2. Luminometrische Expressionsanalyse

Die Expression der rekombinanten β -Galaktosidase in eukaryotischen Zellen wurde in einem Chemilumineszenzassay bestimmt (β -Gal-Reporter-Gen-Assay, Roche). Der Assay beruhte auf der enzymatischen Spaltung eines artifiziellen Substrats (GalactonTM). Hierbei wurde ein Dioxetanring deglykosyliert und bei pH > 12 deprotoniert. Das hierbei emittierte Licht wurde im Luminometer detektiert.

Transfizierte Zellen wurden zunächst lysiert. 10⁵ HeLa-Zellen wurden mechanisch vom Boden des Kulturgefäßes gelöst und in 100 µl Lysis-Puffer 1 h bei RT schüttelnd inkubiert. Der Zellextrakt wurde 2 min, 10.000 x g, 4 °C zentrifugiert, um Zelldebris zu präzipitieren. Der Überstand wurde im Lumineszenztest eingesetzt. 50 µl des Extrakts wurden mit 100 µl der Substratlösung 1 h bei RT in einem Polystyrolröhrchen inkubiert. Durch Zugabe von 50 µl Initiationslösung wurde die Deprotonierung gestartet und die Lumineszenz sofort im Luminometer vermessen (5 s Integrationsdauer).

Lysis-Puffer, Substratlösung, Initiationslösung:

β -Gal-Reporter-Gen-Assay, Nr. 1 758 241 (Roche Diagnostics, Mannheim)

2.5. Morphometrie transduzierter Zellen

2.5.1. Zellfixierung

Infizierte neonatale Kardiomyozyten wurden zur späteren Analyse auf dem Objektträger fixiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS (RT) gewaschen und 20 min mit 4 % PFA inkubiert. Die Zellen wurden erneut mit PBS gewaschen, mit 250 µl Mowiol überschichtet und mit einem Deckgläschen abgedeckt.

PFA, 4 %:

4 g PFA wurden in 100 ml PBS eingewogen und mit 1 N NaOH der pH 7,4 eingestellt. Die Suspension wurde bei 60 °C ca. 30 min bis zum Lösen erhitzt. Aliquots wurden bei -20 °C gelagert.

Mowiol:

6 g Glycerol wurden mit 2,4 g Mowiol gemischt („vortexen“). Nach Zugabe von 6 ml ddH₂O wurde die Suspension 2 – 12 h bei RT inkubiert. 12 ml 0,2 M Tris, pH 8,5 wurden zugemischt und der Ansatz unter mehrfachem Resuspendieren („Vortexen“) 10 min bei 60 °C erhitzt. Die Suspension wurde 15 min bei 5.000 x g pelletiert und Aliquots des Überstands bei -20 °C dunkel aufbewahrt.

2.5.2. Analyse morphologischer Parameter

Die Morphologie primärer Kardiomyozyten wurde im Fluoreszenzmikroskop beurteilt. Zur objektiven, statistisch signifikanten Analyse fluoreszierender Herzmuskelzellen im hohen Durchsatz wurden morphologische Zellparameter im Laser Scanning Cytometer (LSC) vermessen (siehe „Ergebnisse 3.2.2.“).

D. Ergebnisse

Übersicht

Im folgenden Teil der Arbeit werden die Resultate der Implementierung und Anwendung eines Expressionsklonierungssystems zur Identifikation neuer Zielproteine der Herzinsuffizienz beschrieben. Entsprechend den praktischen Arbeitsschritten gliedert sich der Ergebnisteil in fünf Unterpunkte:

1. Es wurde ein adenovirales Vektorsystem generiert, welches die regulierbare Expression rekombinanter Proteine in Kardiomyozyten ermöglichte.
2. Basierend auf humanem Herzgewebe wurde eine normalisierte cDNA-Bank hergestellt und in das Genom der rekombinanten Adenoviren integriert.
3. Im Zellkultursystem wurden primäre Kardiomyozyten aus neonatalen Ratten auf spezifische pathologische Veränderungen infolge der Expression rekombinanter Proteine untersucht.
4. Zur funktionellen Analyse von Kardiomyozyten wurde ein Assay zur Bestimmung morphologischer Parameter entwickelt. Im Rahmen der Expressionsklonierung wurde anschließend die cDNA-Bank in Herzzellen exprimiert, um pathologisch relevante Zielproteine zu identifizieren.
5. Das Genprodukt einer im Assay identifizierten cDNA wurde in weiteren biologischen Experimenten charakterisiert.

In Abbildung 10 wird die Gliederung des Ergebnisteils schematisch dargestellt.

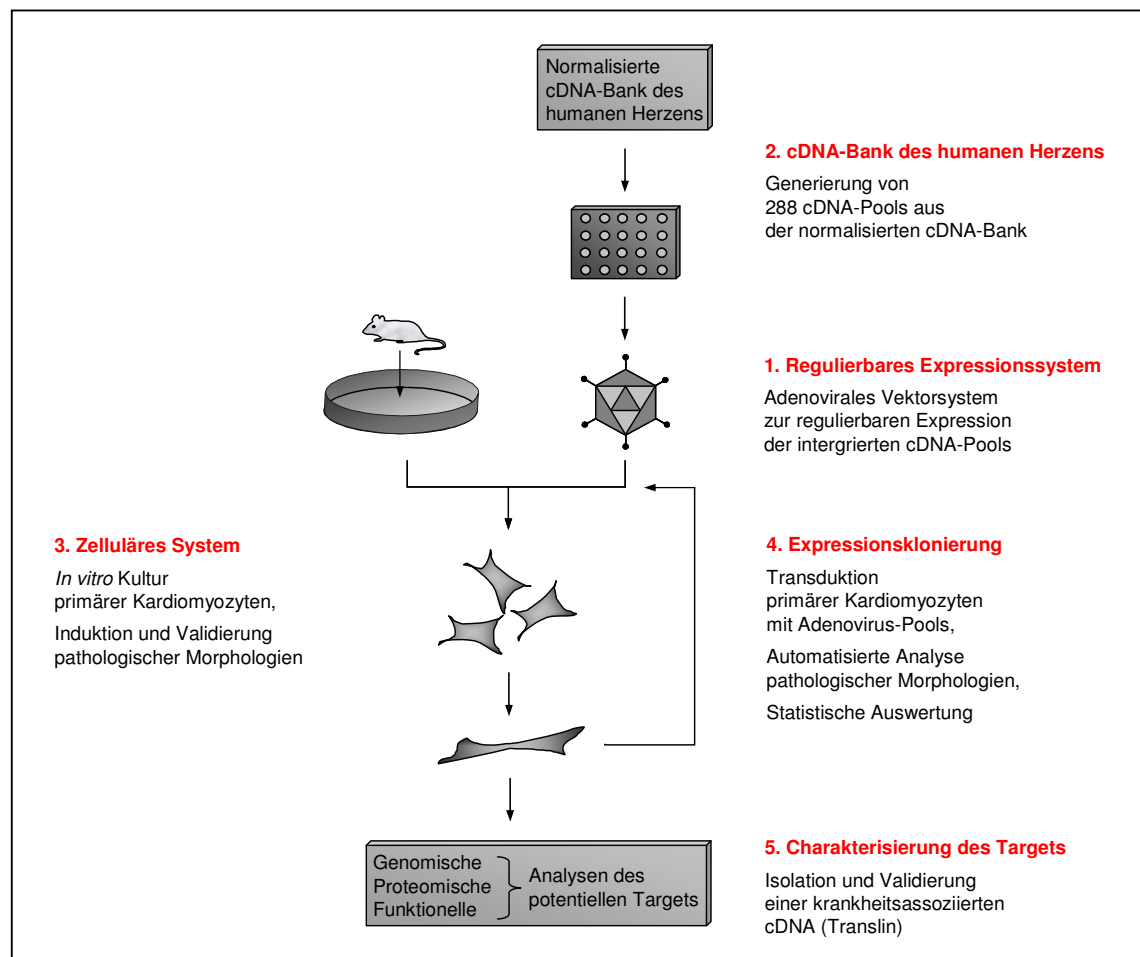
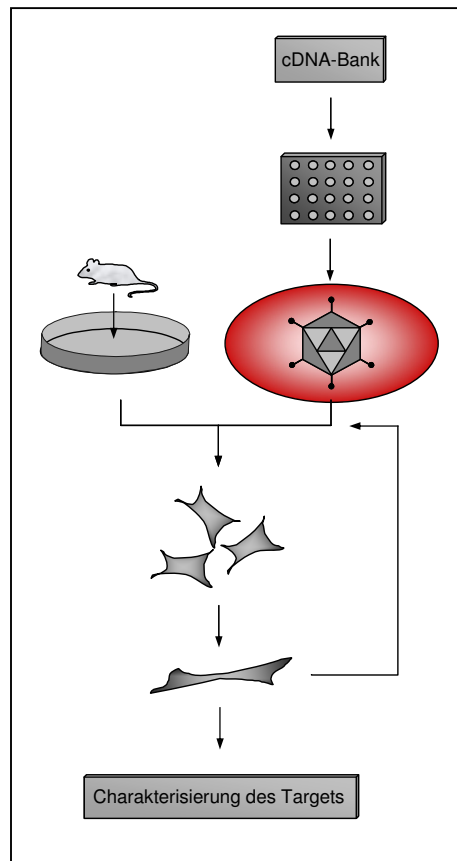


Abbildung 10: Schema der Expressionsklonierung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Expressionsklonierungssystem zur Detektion kausaler Targets der Herzinsuffizienz entwickelt. Durch Transduktion primärer Kardiomyozyten und automatisierte morphologische Zellanalyse konnten cDNAs des humanen Herzens auf ihre Assoziation mit der Erkrankung analysiert werden.

1. Regulierbares Expressionssystem



1.1. Generierung rekombinanter Adenovirusvektoren

Zur funktionellen Analyse rekombinanter Proteine in Kardiomyozyten mussten zunächst die entsprechenden Gensequenzen in die Zelle eingeschleust werden. Als effizienteste Methode erwies sich hierfür die Transduktion mit Adenoviren. Weiterhin war es zur Analyse ganzer cDNA-Banken notwendig, Gene in hoher Anzahl in Adenoviren zu integrieren. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit die rekombinanten Adenovirusplasmide pKA1 – pKA4 konstruiert, in welche Gensequenzen mittels homologer Rekombination (Gateway-System, Invitrogen, siehe „Methoden 2.1.6.“) integriert werden konnten. Anschließend wurden die auf den Plasmiden basierenden rekombinanten Adenoviren in HEK-Zellen produziert.

Eine repräsentative Herstellung von Viren mit potenziell toxischen cDNA-Sequenzen war nur unter der Voraussetzung möglich, dass während der Virusproduktion keine Transkription der cDNA stattfand. Daher wurde in das Virusplasmid pKA3 ein induzierbarer Promotor integriert (Gene-Switch, Invitrogen, siehe „Methoden 2.1.8.“), mit dem die Genexpression während der Virusamplifikation und Transduktion reguliert wurde. Zur Detektion infizierter Zellen wurde zusätzlich ein zweites Cistron in das Plasmid pKA3 eingesetzt, das für das Cyan Fluorescent Protein (CFP) kodierte. Das konstitutiv in transduzierten Zellen exprimierte Protein konnte im Fluoreszenzmikroskop analysiert werden.

Während die auf dem Plasmid pKA3 basierenden rekombinanten Adenoviren im Expressionsklonierungssystem zum Einsatz kamen, wurden zusätzlich drei Virusplasmide für weitergehende Analysen einzelner cDNAs konstruiert. Das Plasmid pKA2 diente der konstitutiven Expression und wurde wie pKA3 bicistronisch aufgebaut. Die Virusplasmide pKA1 und pKA4 ermöglichten die konstitutive bzw. induzierbare Expression rekombinanter CFP-Fusionsproteine. Die entsprechenden Adenoviren AV pKA1 und AV pKA4 wurden zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation rekombinanter Proteine eingesetzt. Die Merkmale der rekombinanten Adenovirusgenome werden in der Abbildung 11 aufgeführt.

Adenovirusplasmid	Rekombinationskassette	Expression des rekombinanten Gens	Expression des CFP-Markerproteins
pKA 1	+	konstitutiv	als Fusionsprotein
pKA 2	+	konstitutiv	von zweitem Cistron
pKA 3	+	induzierbar	von zweitem Cistron
pKA 4	+	induzierbar	als Fusionsprotein

Abbildung 11: Merkmale der rekombinanten Adenovirusplasmide

Ein modularer Aufbau der Plasmide ermöglichte die effiziente Anpassung der Vektorsysteme an die jeweiligen Assay-Systeme. Die entsprechenden Promotoren und Expressionskassetten wurden in separaten pShuttle-Vektoren (Qbiogene) zusammengesetzt. Dabei wurden Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen in der Weise modifiziert, dass sie eine Kombination verschiedener Module im Zielvektor pKS ermöglichten. Die Expressionskassetten dieser Plasmide (pKS1 – pKS4) wurden anschließend in das Genom des rekombinanten Adenovirus (Serotyp 5, deletiert in den genomischen Bereichen E1 und E3) eingesetzt. Die Klonierungsschritte der vier resultierenden Adenovirusvektoren pKA1 – pKA4 werden in den nachfolgenden Abbildungen 12 bis 17 dargestellt.

Die aufgeführten Module wurden zum Aufbau der Plasmide pKS1 – pKS4 und der Adenovirusvektoren pKA1 – pKA4 verwendet. Zur übersichtlichen Darstellung werden die entsprechenden Nukleinsäurebereiche der Ausgangsplasmide in linearer Form in Abbildung 12 aufgeführt.

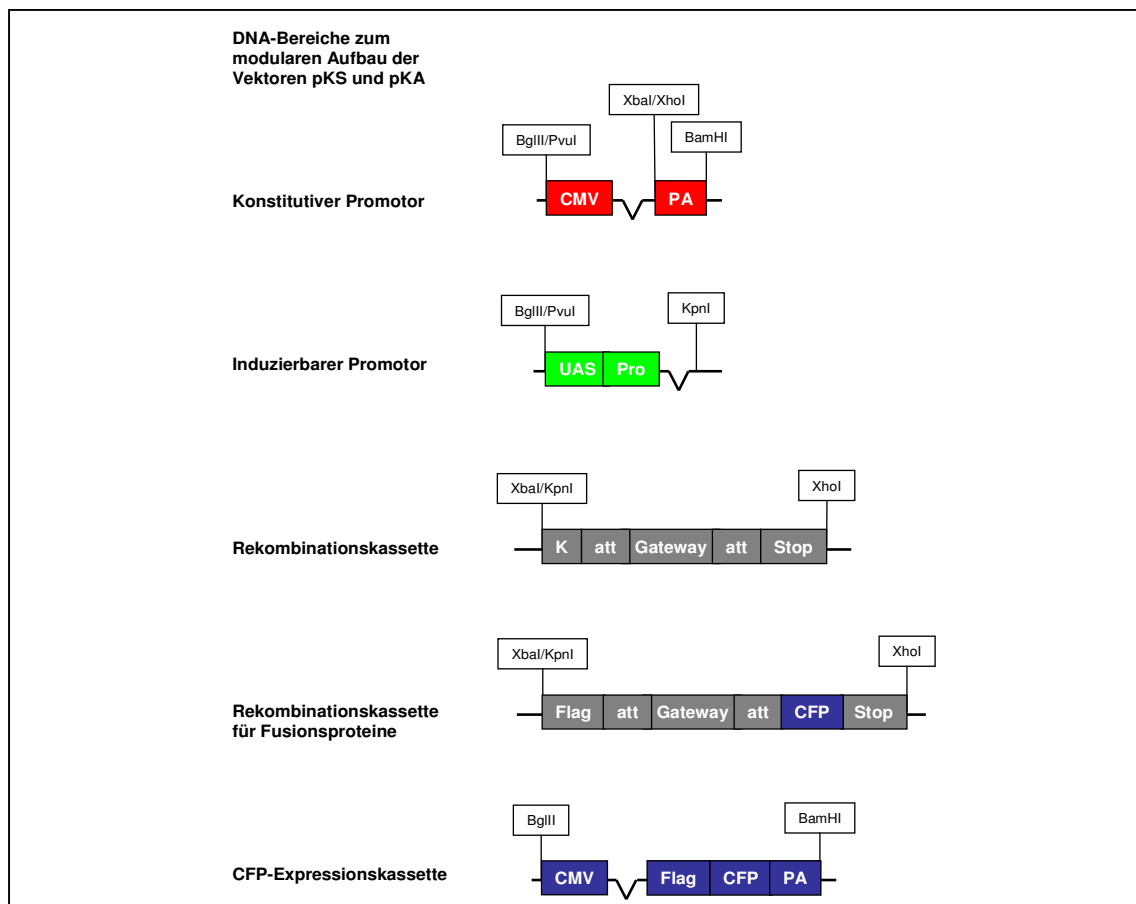


Abbildung 12: Module zur Generierung der Plasmide pKS1 – pKS4 sowie der Adenovirusvektoren pKA1 – pKA4

Die DNA-Bereiche für Promotor und Expressionskassetten wurden in pShuttle-Vektoren (Qbiogene) eingesetzt.

CMV:	konstitutiver Cytomegalovirus-Promotor
PA:	Polyadenylierungssignal
UAS:	Upstream Activator Sequence, Bindungsstellen des GAL4-Transkriptionsaktivators
Pro:	Adenovirus E1b TATA-Sequenz
K:	Kozak-Sequenz
att:	Attachment-Site attR, DNA-Sequenz zur <i>in vitro</i> Rekombination von Expressionsvektor und zu integrierendem Nukleinsäurefragment
Gateway:	Rekombinationskassette des Gateway-Systems (Invitrogen)
Stop:	Kodon zur Termination der Transkription
CFP:	Cyan Fluorescent Protein
BglII etc.:	Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen

Zunächst wurden die Plasmide pKS2 und pKS3 zur Expression rekombinanter Proteine und des Markerproteins CFP generiert. Das in Abbildung 13 gezeigte Plasmid pKS2 wurde zur bicistronischen, konstitutiven Expression eingesetzt. Die Rekombinationskassette und die CFP-Expressionskassette wurden in den Vektor pKS integriert.

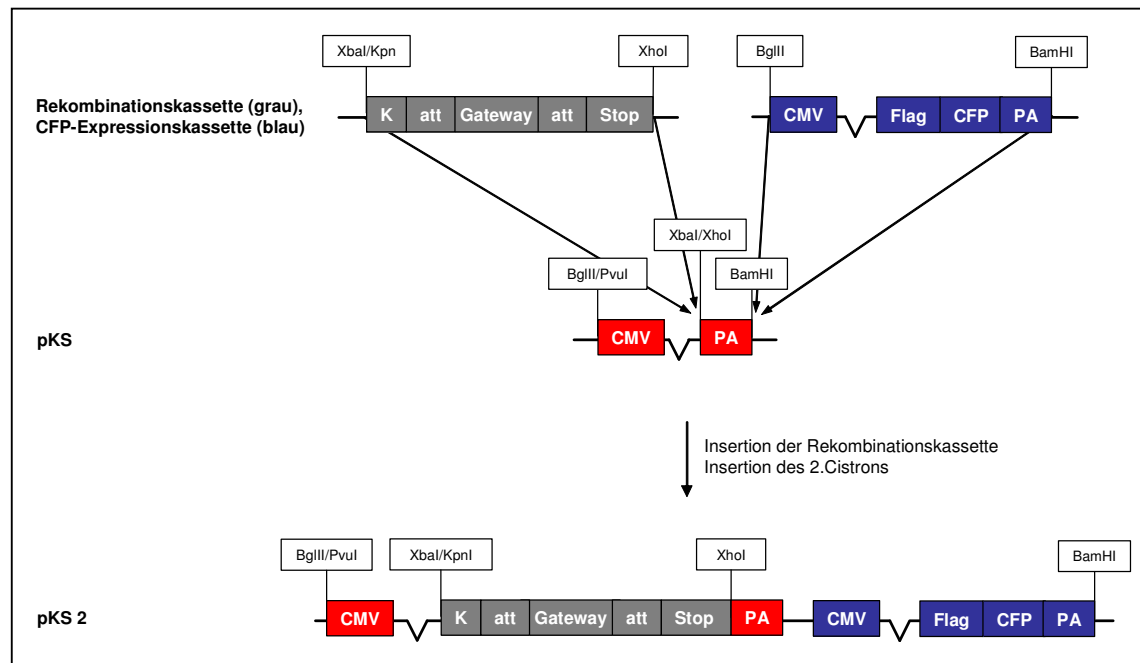


Abbildung 13: Generierung des Plasmids pKS2 zur konstitutiven, bicistronischen Proteinexpression

Zwei Kassetten zur konstitutiven Expression rekombinanter Proteine und konstitutiven Expression von CFP wurden in Vektor pKS eingesetzt.

CMV:	konstitutiver Cytomegalovirus-Promotor
PA:	Polyadenylierungssignal
K:	Kozak-Sequenz
att:	Attachement-Site attR, DNA-Sequenz zur <i>in vitro</i> Rekombination von Expressionsvektor und zu integrierendem Nukleinsäurefragment
Gateway:	Rekombinationskassette des Gateway-Systems (Invitrogen)
Stop:	Kodon zur Termination der Transkription
CFP:	Cyan Fluorescent Protein
BglII etc.:	Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen

Das Plasmid pKS3 wurde zur induzierbaren Expression rekombinanter Proteine und der konstitutiven Expression des Markerproteins CFP verwendet. Zu seiner Herstellung wurde der konstitutive CMV-Promotor des Plasmids pKS2 durch den induzierbaren Promotor des Gene-Switch-Systems (Invitrogen) ausgetauscht, siehe Abbildung 14.

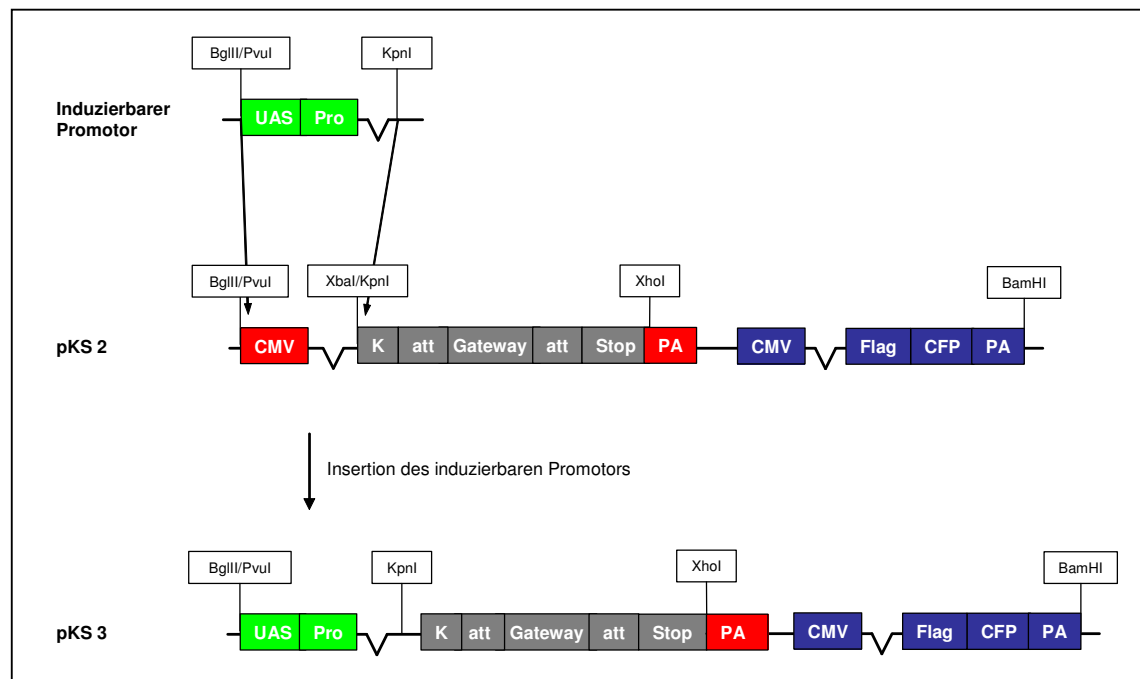


Abbildung 14: Generierung des Plasmids pKS3 zur induzierbaren Expression rekombinanter Proteine und konstitutiven Expression von CFP

Der konstitutive Promotor des Plasmids pKS2 wurde gegen den induzierbaren Promotor (Gene-Switch, Invitrogen) ausgetauscht.

CMV:	konstitutiver Cytomegalovirus-Promotor
PA:	Polyadenylierungssignal
UAS:	Upstream Activator Sequence, Bindungsstellen des GAL4-Transkriptionsaktivators
Pro:	Adenovirus E1b TATA-Sequenz
K:	Kozak-Sequenz
att:	Attachment-Site attR, DNA-Sequenz zur <i>in vitro</i> Rekombination von Expressionsvektor und zu integrierendem Nukleinsäurefragment
Gateway:	Rekombinationskassette des Gateway-Systems (Invitrogen)
Stop:	Kodon zur Termination der Transkription
CFP:	Cyan Fluorescent Protein
BglII etc.:	Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen

Nachfolgend wurden die Vektoren pKS1 und pKS4 zur Expression rekombinanter Proteine mit C-terminaler CFP-Fusion hergestellt. Der Vektor pKS1 zur konstitutiven Expression wurde, wie in Abbildung 15 dargestellt, durch Insertion der Rekombinationskassette in das Plasmid pKS erstellt.

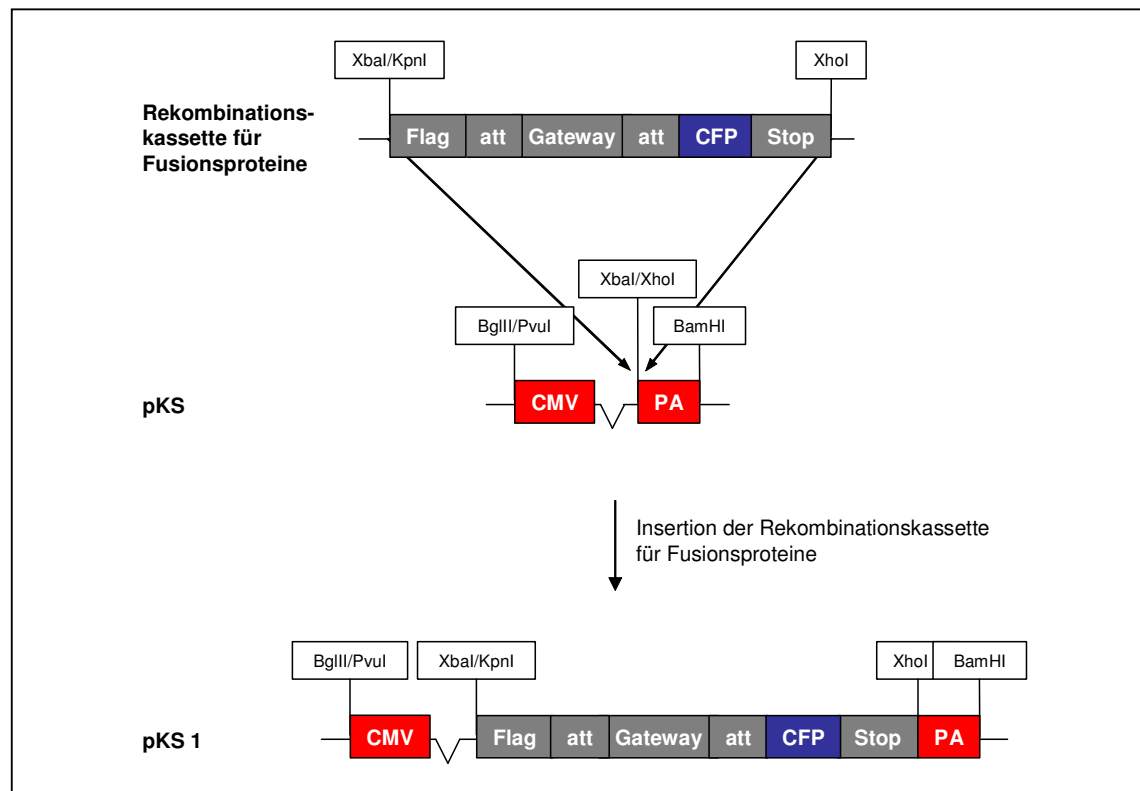


Abbildung 15: Generierung des Plasmids pKS1 zur konstitutiven Expression rekombinanter Fusionsproteine

Die Kasse zur konstitutiven Expression rekombinanter CFP-Fusionsproteine wurde in Vektor pKS eingebracht.

CMV:	konstitutiver Cytomegalovirus-Promotor
PA:	Polyadenylierungssignal
K:	Kozak-Sequenz
att:	Attachment-Site attR, DNA-Sequenz zur <i>in vitro</i> Rekombination von Expressionsvektor und zu integrierendem Nukleinsäurefragment
Gateway:	Rekombinationskassette des Gateway-Systems (Invitrogen)
Stop:	Kodon zur Termination der Transkription
CFP:	Cyan Fluorescent Protein
BglII etc.:	Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen

Die induzierbare Expression von CFP-Fusionsproteinen wurde durch den Vektor pKS4 ermöglicht. Zu seiner Herstellung wurde in den Vektor pKS1 anstelle des konstitutiven CMV-Promotors das Modul des induzierbaren Promotors (Gene-Switch-System, Invitrogen) eingesetzt, siehe Abbildung 16.

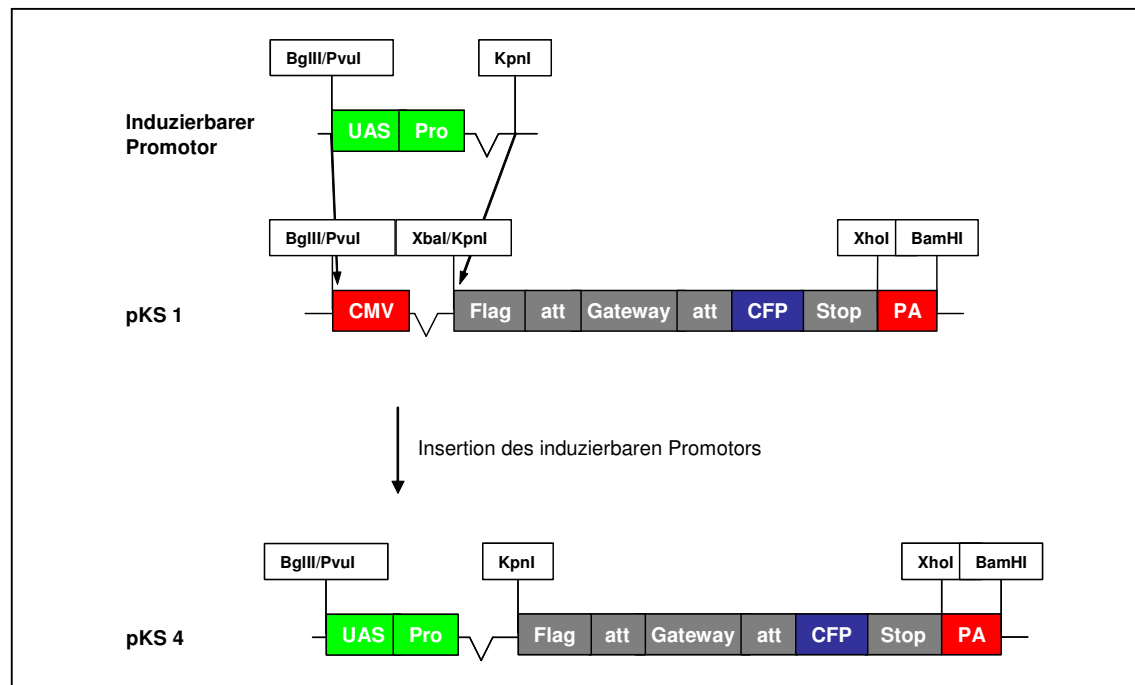


Abbildung 16: Generierung des Plasmids pKS4 zur induzierbaren Expression rekombinanter Fusionsproteine

Der konstitutive Promotor des Plasmids pKS1 wurde gegen den induzierbaren Promotor (Gene-Switch, Invitrogen) ausgetauscht.

CMV:	konstitutiver Cytomegalovirus-Promotor
PA:	Polyadenylierungssignal
UAS:	Upstream Activator Sequence, Bindungsstellen des Gal4-Transkriptionsaktivators
Pro:	Adenovirus E1b TATA-Sequenz
K:	Kozak-Sequenz
att:	Attachment-Site attR, DNA-Sequenz zur <i>in vitro</i> Rekombination von Expressionsvektor und zu integrierendem Nukleinsäurefragment
Gateway:	Rekombinationskassette des Gateway-Systems (Invitrogen)
Stop:	Kodon zur Termination der Transkription
CFP:	Cyan Fluorescent Protein
BglII etc.:	Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen

Die Kassetten zur konstitutiven bzw. induzierbaren Expression der Plasmide pKS1 – pKS4 wurden, wie in Abbildung 17 gezeigt, in das Genom des rekombinanten Adenovirus integriert. Zur Replikation und Modifikation durch homologe Rekombination der Vektoren in *S. cerevisiae* wurden zusätzlich Nukleotidsequenzen des Centromers, Replikationsstartpunkts und Histidin-Selektionsmarkers integriert. Die resultierenden Vektoren pKA1 – pKA4 wurden zur Produktion der rekombinanten Adenoviren AV pKA1 – AV pKA4 in HEK-Zellen verwendet. Die Viren wurden anschließend zur Transduktion primärer Kardiomyozyten eingesetzt.

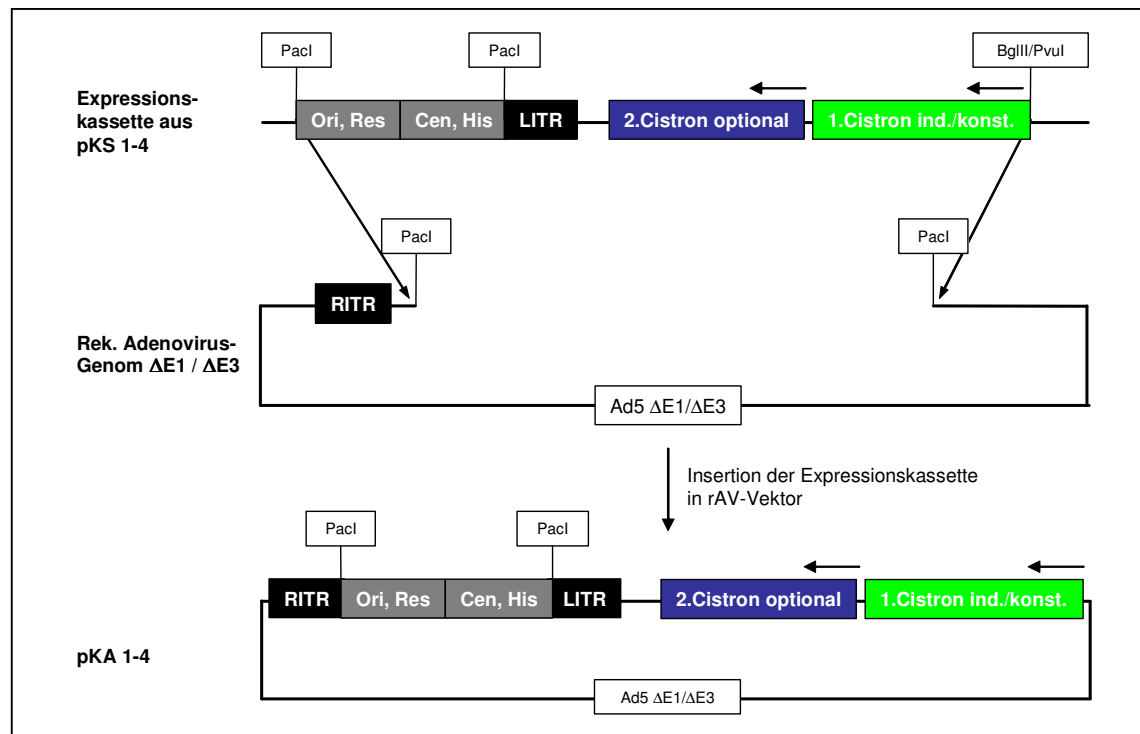


Abbildung 17: Generierung der Adenovirusplasmide pKA1 – pKA4

Die Expressionskassetten der Plasmide pKS1 – pKS4 wurden in das Genom eines modifizierten rekombinanten Adenovirus eingesetzt. Die daraus resultierenden Virusvektoren wurden dementsprechend als pKA1 – pKA4 bezeichnet.

ORI:	Origin of Replication, Replikationsstartpunkt aus <i>E. coli</i>
Res:	Ampicillinresistenz
LITR / RITR:	Left / Right Inverted Terminal Repeat, invertierte Basensequenz zur viralen Replikation
Ad5 ΔE1 / ΔE3:	rekombinantes Adenovirus, Serotyp5, deletiert in Genen E1 und E3
CEN:	Centromer CEN6 und autonomer Replikationsstartpunkt ARSH4 aus <i>S. cerevisiae</i>
HIS:	Selektionsmarker HIS3 zur auxotrophen Selektion in <i>S. cerevisiae</i>
Pacl etc.:	Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen

Die Regulation des induzierbaren Promotors der Plasmide pKA3 und pKA4 erfolgte durch spezifische Bindung eines chimären Transkriptionsfaktors (Gene-Switch, Invitrogen, siehe „Methoden 2.1.8.“). Wie die zuvor beschriebenen Vektoren wurde auch das für den Transkriptionsfaktor kodierende, rekombinante Adenovirusplasmid pKA Switch modular aufgebaut. Die entsprechenden DNA-Bereiche der Ausgangsvektoren werden in linearer Form in der nachfolgenden Abbildung 18 aufgeführt.

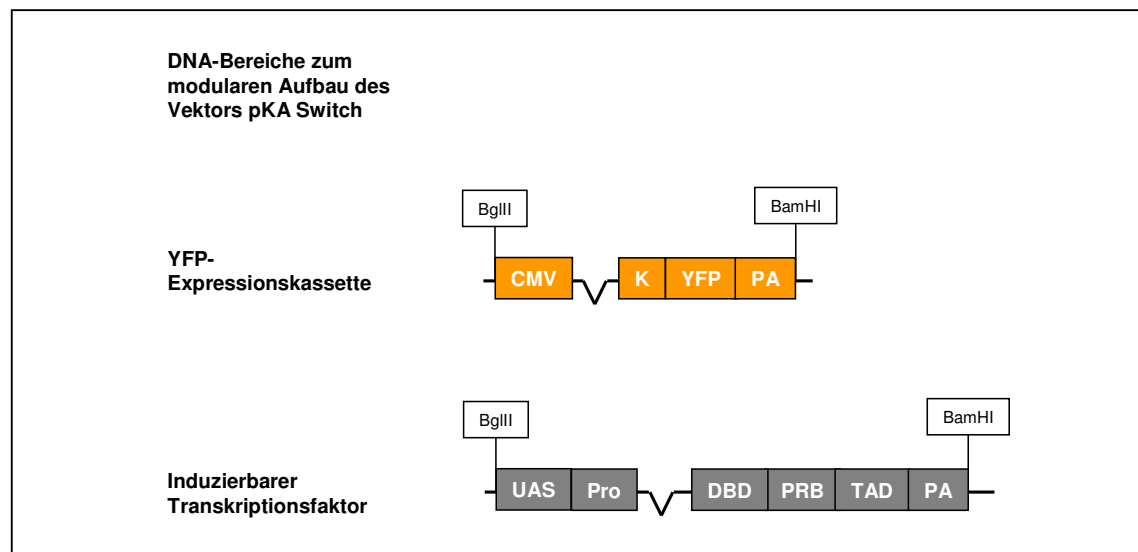


Abbildung 18: Module zur Generierung des Adenovirusplasmids pKA-Switch

Die DNA-Bereiche zur Expression des Transkriptionsfaktors und YFP wurden in pShuttle-Vektoren (Qbiogene) eingesetzt.

CMV:	konstitutiver Cytomegalovirus-Promotor
PA:	Polyadenylierungssignal
UAS:	Upstream Activator Sequence, Bindungsstellen des GAL4-Transkriptionsaktivators
Pro:	Herpes-Simplex-Virus Thymidinkinase-Minimalpromotor
K:	Kozak-Sequenz
YFP:	Yellow Fluorescent Protein
DBD:	DNA-Bindungsdomäne
PRB:	Antiprogesteron-Bindedomäne
TAD:	Trans-Aktivierungsdomäne
BglIII etc.:	Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen

Die Expressionskassette zur Bildung des Transkriptionsfaktors wurde in den Vektor pShuttle (Qbiogene) integriert. Zur späteren Kontrolle der Transduktion wurde ein zweites Cistron für die konstitutive Expression des Yellow Fluorescent Proteins (YFP) eingefügt. Über homologe Rekombination (AdEasy System, Qbiogene, siehe „Methoden 2.1.7.“) wurde anschließend die bicistronische Expressionskassette des pShuttle in das rekombinante Adenovirusgenom eingebracht. Das resultierende Plasmid zur Herstellung rekombinanter Adenoviren wurde mit pKA Switch bezeichnet. Das rekombinante Adenovirus AV pKA Switch wurde zur Kotransduktion primärer Herzmuskelzellen in Kombination AV pKA3 bzw. AV pKA4 zur induzierbaren Expression rekombinanter Proteine verwendet.

Der Aufbau des Virusplasmids pKA Switch wird in der folgenden Abbildung 19 dargestellt.

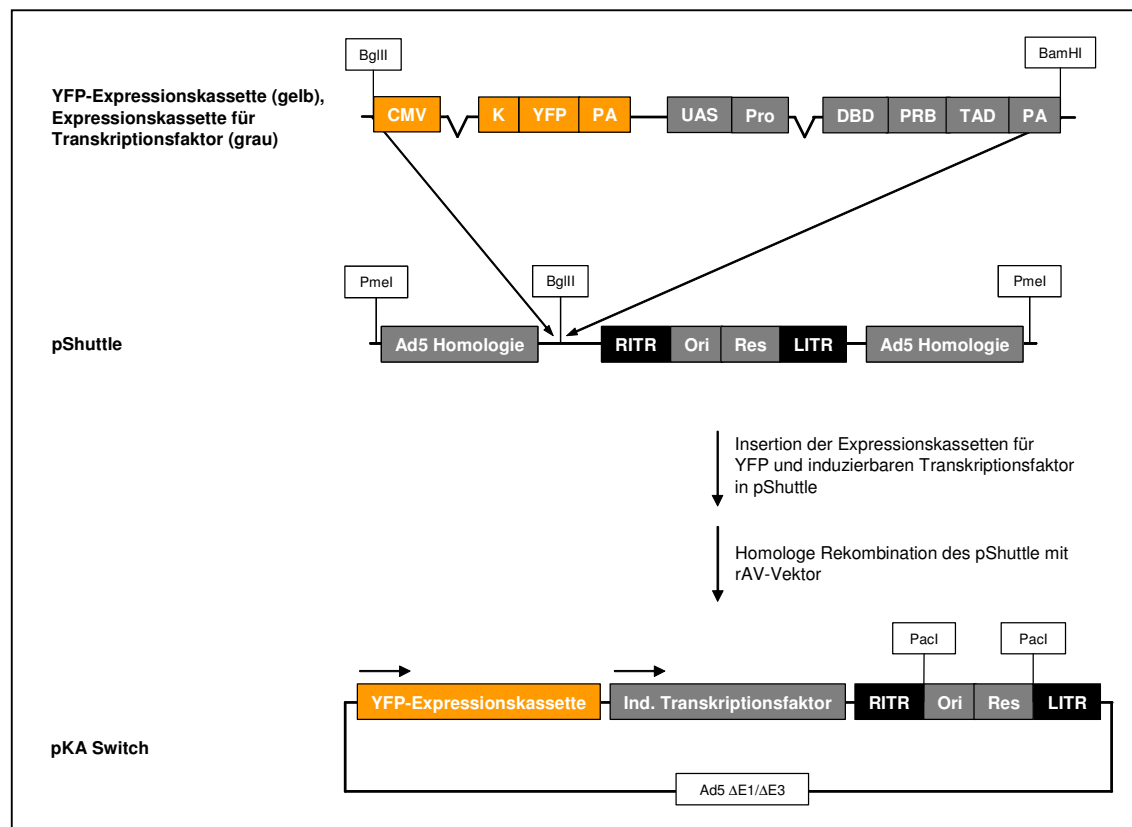


Abbildung 19: Generierung des Adenovirusplasmids pKA-Switch zur bicistronischen Expression des Transkriptionsfaktors und YFPs

Die Kassetten zur Expression des Transkriptionsfaktors und YFP wurden in den Vektor pShuttle (Qbiogene) eingesetzt. Durch Rekombination von pShuttle und rekombinanten Adenovirusgenom (Serotyp 5, deletiert in Genen E1 und E3) wurde der Virusvektor pKA-Switch hergestellt. Legende: siehe nächste Seite

Ad5 Homologie:	Bereiche des Vektors pKS zur homologen Rekombination mit Adenovirusgenom, Serotyp 5
ORI:	Origin of Replication, Replikationsstartpunkt
Res:	Kanamycinresistenz
LITR / RITR:	Left / Right Inverted Terminal Repeat, invertierte Basensequenz zur viralen Replikation
Ad5 Δ E1 / Δ E3:	rekombinantes Adenovirusgenom, Serotyp5, deletiert in Genen E1 und E3
CMV:	konstitutiver Cytomegalovirus-Promotor
K:	Kozak-Sequenz
YFP:	Yellow Fluorescent Protein
PA:	Polyadenylierungssignal
UAS:	Upstream Activator Sequence, Bindungsstellen des GAL4-Transkriptionsaktivators
Pro:	Herpes-Simplex-Virus Thymidinkinase-Minimalpromotor
DBD:	DNA-Bindungsdomäne
PRB:	Antiprogesteron-Bindungsdomäne
TAD:	Trans-Aktivierungsdomäne
BglII etc.:	Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen

Für die Expressionsklonierung in Kardiomyozyten war der Adenovirusvektor pKA3 elementar. Um eine Expression unbekannter cDNAs in allen potenziellen Leserastern zu ermöglichen, wurde pKA3 als Vektorsystem bestehend aus den Plasmiden pKA3 a, pKA3 b und pKA3 c generiert. Ihre Expressionskassetten wurden dementsprechend in drei verschiedenen Leserahmen in die Vektoren integriert.

Das rekombinante Adenovirus AV pKA3 (a, b, c) wurde zusammen mit AV pKA Switch zur regulierbaren Expression der cDNAs in Kardiomyozyten eingesetzt. Die Vektor- und Nukleotidkarte von AV pKA3 werden in der Abbildung 20 und 21 dargestellt.

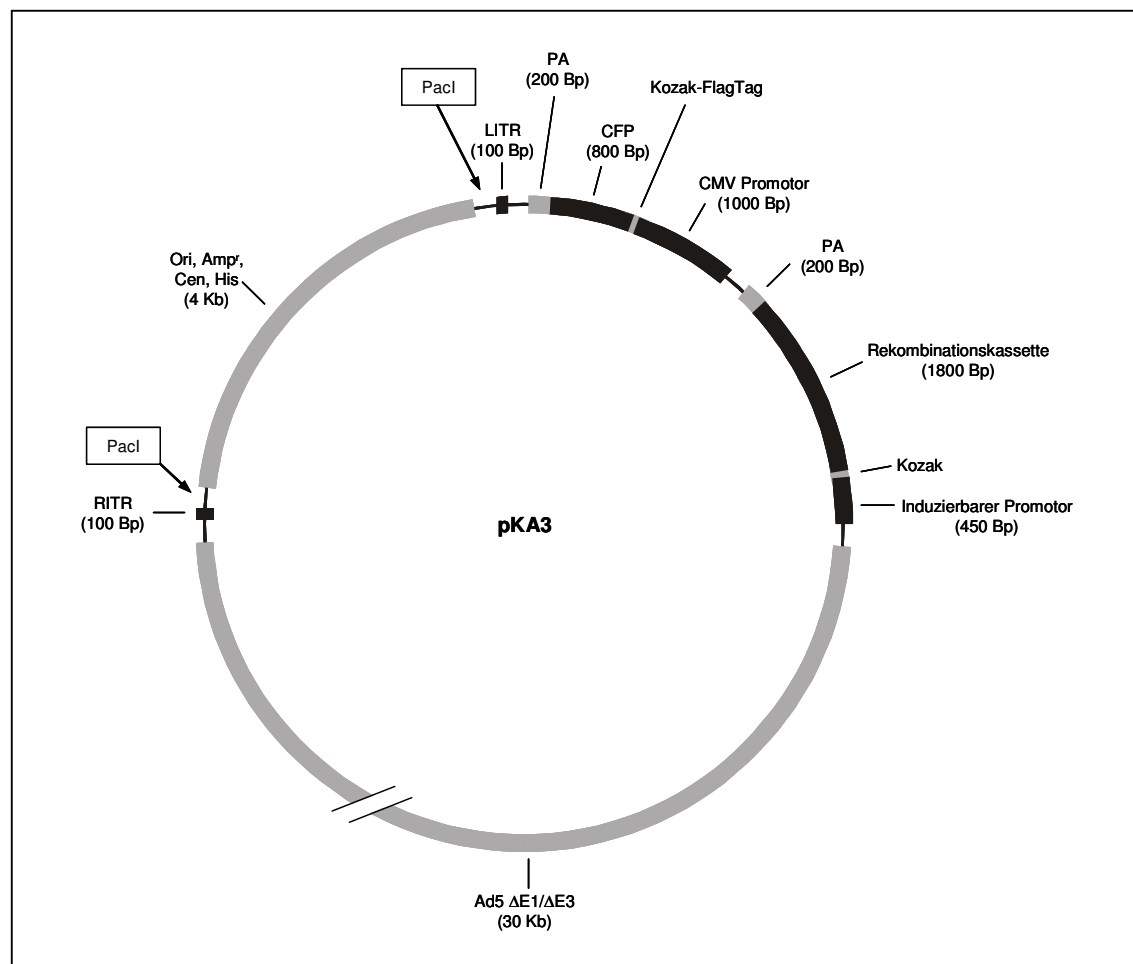


Abbildung 20: Vektorkarte des Adenovirusplasmids pKA3

Der Vektor diente der regulierbaren Expression rekombinanter Proteine bei gleichzeitiger konstitutiver CFP-Expression. Dargestellt wurde das zirkuläre Plasmid zur Replikation in Bakterien. Zur Verpackung der Viren wurde der Vektor mit PaclI linearisiert und anschließend zur Transfektion von HEK-Zellen eingesetzt. Alle Genbereiche mit Ausnahme des deletierten Adenovirusgenoms sind maßstabsgerecht dargestellt. Die Größe des Vektors beträgt 34 Kb.

Ad5 $\Delta E1 / \Delta E3$:	rekombinantes Adenovirusgenom, Serotyp5, deletiert in Genen E1 und E3
PA:	Polyadenylierungssignal
CMV:	konstitutiver Cytomegalovirus-Promotor
CFP:	Cyan Fluorescent Protein
PA:	Polyadenylierungssignal
LITR / RITR	Left / Right Inverted Terminal Repeat, invertierte Basensequenz zur viralen Replikation
ORI	Origin of Replication, Replikationsstartpunkt aus <i>E. coli</i>
Amp ^r :	Ampicillinresistenz
CEN:	Centromer CEN6 und autonomer Replikationsstartpunkt ARSH4 aus <i>S. cerevisiae</i>
HIS:	Selektionsmarker HIS3 zur auxotrophen Selektion in <i>S. cerevisiae</i>
PaclI:	Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen

1	[Bgl II]	[Pvu I]	[Bgl II]	[GAL4-Bindungsstelle]
	GGA AGATCTT	CG CGATCGCG	A AGATCTT CA	AG CGGAGTAC TGCTCCGA
60	[GAL4-Bindungsstelle]	[GAL4-Bindungsstelle]		
	GTGGAGTACT GTCTCCGAG	CGGAGTACTG TCCTCCGAGT	CGAGGGTCGA	
110	[GAL4-Bindungsstelle]	[GAL4-Bindungsstelle]	[GAL4-Bindungsstelle]	
	AGCGGAGTAC TGCTCCGA	GTGGAGTACT GTCTCCGAG	CGGAGTACTG	
160		[Xba I, deletiert]	[AV E1b TATA-Sequenz]	
	TCCTCCGAGT	CGACTCTGCA	GAGGGTATAT AATGATCTGA	GATATCGGAG
210				
	CTCGTTTAGT	GAACCGTCAG	ATCGCCTGGA	GACGCCATCC ACGCTGTTTT
260				
	GACCTCCATA	GAAGACACCG	GGACCGATCC	AGCCTCCGCG GCCGGAACGG
310			[Pac I, deletiert]	[Intron IV S8]
	TGCATTGGAA	CGCGCATTCC	CCGTG TTTA	ACAGGTAAGT GTCTTCTCC
360				
	TGTTTCTTC	CCCTGCTATT	CTGCTCAACC	TTCCTATCAG AAACTGCAGT
410				
	ATCTGTATTT	TTGCTAGCAG	TAATACTAAC	GGTTCTTTTT TTCTCTTAC
460		[Kpn I]	[Kozak-Sequenz]	[Mfe I] [Gateway-Kassette C]
	AGGCCACGGG	GTACCCCTCC	ACCATGGGAC	AATTGGATCA AACAAGTTG
510		2188	[Gateway-Kassette C]	[3x Stop-Codon]
	TACAAAAAAG.....TT	CTTGTA CAAA	GTGGTTCGAT	ATTAATTAG A
2220	[Xho I]			
	TGATCCGC	TAGAG	CGGAA C....	

Abbildung 21: Nukleotidequenz des 1. Cistrons aus Adenovirusplasmid pKA3

Die Nukleinsäuresequenz des ersten Cistrons zur homologen Rekombination und regulierbaren Genexpression des adenoviralen Vektors pKA3 wurde bestimmt (vgl. Abbildung 14).

Bgl II, Pvu I etc.	Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen
GAL4:	Bindungsstellen des GAL4-Transkriptionsaktivators
Gateway-Kassette:	Rekombinationskassette zur Integration von cDNAs (Invitrogen)
AV E1b TATA-Sequenz:	Adenoviraler Minimalpromotor
Kozak-Sequenz:	Translations-Initiierungssignal

Die weiteren DNA-Sequenzen zur Herstellung des Vektors pKA3 können in den folgenden Referenzen eingesehen werden. Ihre Verwendung im Plasmid pKA3 wurde durch Sequenz- und Restriktionsanalysen überprüft.

Notwendige Nukleotidsequenzen zur Generierung des Vektors pKA3:

- Gateway Cassette (Invitrogen), Leseraster C.1, 1714 Bp:
http://www.invitrogen.com/content/sfs/vectors/rfc_1_seq.txt
- CMV-Promotor und Polyadenylierungssignal des Vektors pCI (Promega), 4006 Bp:
<http://www.promega.com/vectors/pci.txt>
- Cyan fluorescent protein (Clontech), 792 Bp:
<http://www.clontech.com/techinfo/vectors/vectorsJ-L/pdf/pLP-ECFP-C1seq.pdf>
- pShuttle (Qbiogene), 6621 Bp:
<http://www.qbiogene.com/literature/maps/txt/s-pShuttle.txt>
- pAdEasy1 (Qbiogene), 33441 Bp:
<http://www.qbiogene.com/literature/maps/txt/s-pAdEasy-1.txt>

1.2. *In vitro* Charakterisierung des rekombinanten Adenovirus pKA3

Der Vektor pKA3 wurde zur Expressionsklonierung in primären Kardiomyozyten eingesetzt. Vorab wurde die regulierbare Expression einer in pKA3 integrierten cDNA *in vitro* untersucht.

1.2.1. Induzierbares Expressionssystem in HeLa Zellen

Zunächst sollte der induzierbare Promotor des Gene-Switch-Systems (Invitrogen) untersucht werden. Die Funktionsweise des Systems wird im Abschnitt „Methoden 2.1.8.“ erklärt.

Hierzu wurden HeLa Zellen mit den Plasmiden für den Transkriptionsfaktor und die regulierbare Expressionskassette der bakteriellen β -Galaktosidase des Gene-Switch-Systems (pSwitch, pGene/lacZ, Invitrogen) transfiziert. Die Lumineszenzanalyse 24 h nach der Transfektion zeigte, dass durch Zugabe von 10^{-8} M Mifepriston eine 2.000fache Induktion relativ zum Wert nicht transfizierter Zellen möglich war. Die Analyse nicht induzierter Zellen ließ jedoch eine hohe Basalaktivität des Promotors erkennen: Mit dem Plasmid der Expressionskassette transfizierte Zellen wiesen bereits eine dreifache, relative Induktion auf. Wurden HeLa Zellen hingegen mit beiden für das System notwendigen Plasmiden transfiziert, stieg die Basalaktivität in Abwesenheit von Mifepriston auf das 20fache des Kontrollwertes nicht transfizierter Zellen an. Diese Ergebnisse werden in der Abbildung 22 aufgeführt.

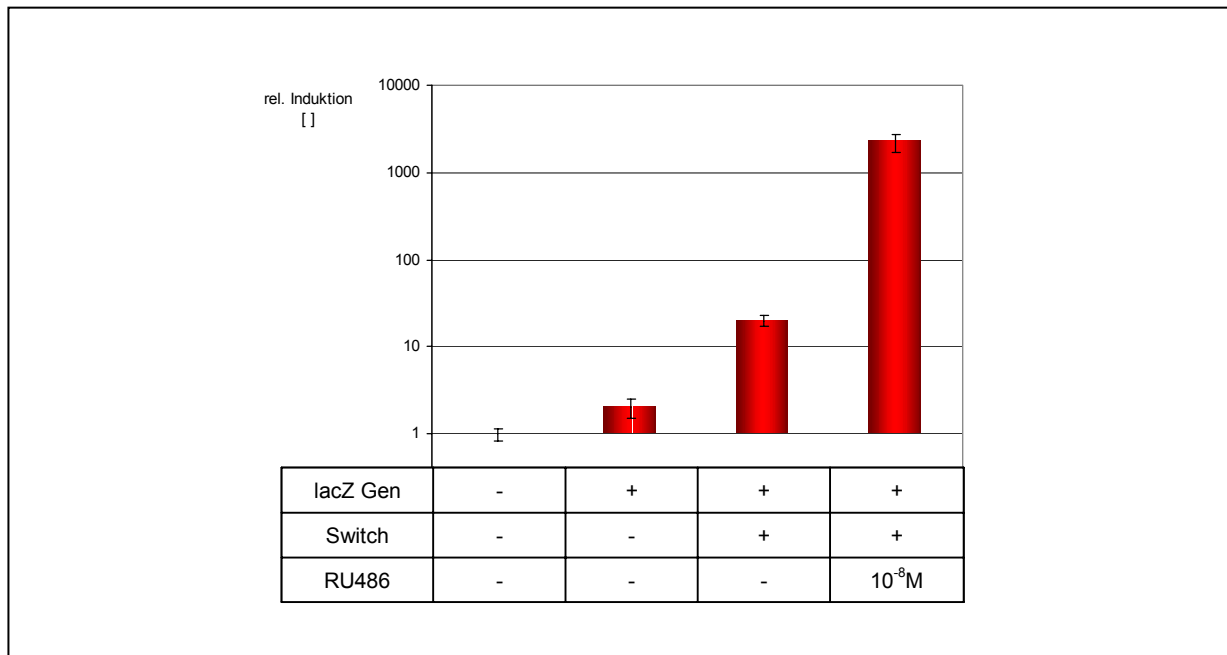


Abbildung 22: Analyse des induzierbaren Expressionssystems (Gene-Switch, Invitrogen) in HeLa Zellen (Lumineszenzassay)

HeLa Zellen wurden mit den Plasmiden für den Transkriptionsfaktor (Switch) und das induzierbare β -Galaktosidase-Gen transfiziert. Im nicht induzierten Zustand wies das System eine Basalaktivität bis zu 20fach über dem Hintergrund auf. Durch Mifepriston (RU 486) konnte eine 2.000fache Induktion erzielt werden. (n = 6)
Fehlerbalken = Standardabweichung

1.2.2. Induzierbares, virales Expressionssystem in Kardiomyozyten

1.2.2.1. Abhängigkeit der Expression vom Virustiter

Wie in Abschnitt „Ergebnisse 1.1.“ beschrieben, wurde das induzierbare Expressionssystem (Gene-Switch, Invitrogen) in adenovirale Vektoren integriert.

Für die Charakterisierung des viralen Expressionssystems wurden rekombinante Adenoviren zur regulierbaren Expression der bakteriellen β -Galaktosidase (AV pKA3-lacZ) und konstitutiven Expression des Transkriptionsfaktors (AV pKA-Switch) hergestellt. Primäre Kardiomyozyten wurden mit unterschiedlichen Dosen beider Viren infiziert und die rekombinante Genexpression durch Zugabe von Mifepriston induziert. Hierbei zeigte sich, dass das virale Expressionssystem keine messbare basale Aktivität aufwies. Im induzierten Zustand war es möglich, die Expression der β -Galaktosidase auch durch die Virusmenge zu regulieren. Das Expressionssignal verhielt sich proportional zur Dosis beider Viren. Erst bei Virusmengen von mehr als 16 infektiösen Partikeln pro Zelle (MOI > 16) für AV pKA-Switch wurde eine Abnahme der β -Galaktosidase-Expression detektiert. Untersuchungen am Fluoreszenzmikroskop zeigten hierbei, dass zu hohe Dosen des AV pKA-Switch eine artifizielle Morphologie der Zellen hervorriefen. Virusmengen > MOI 30 für AV pKA-Switch führten zum Ablösen und Absterben der Zellen. Die Daten werden in der folgenden Abbildung 23 als Säulendiagramm gezeigt.

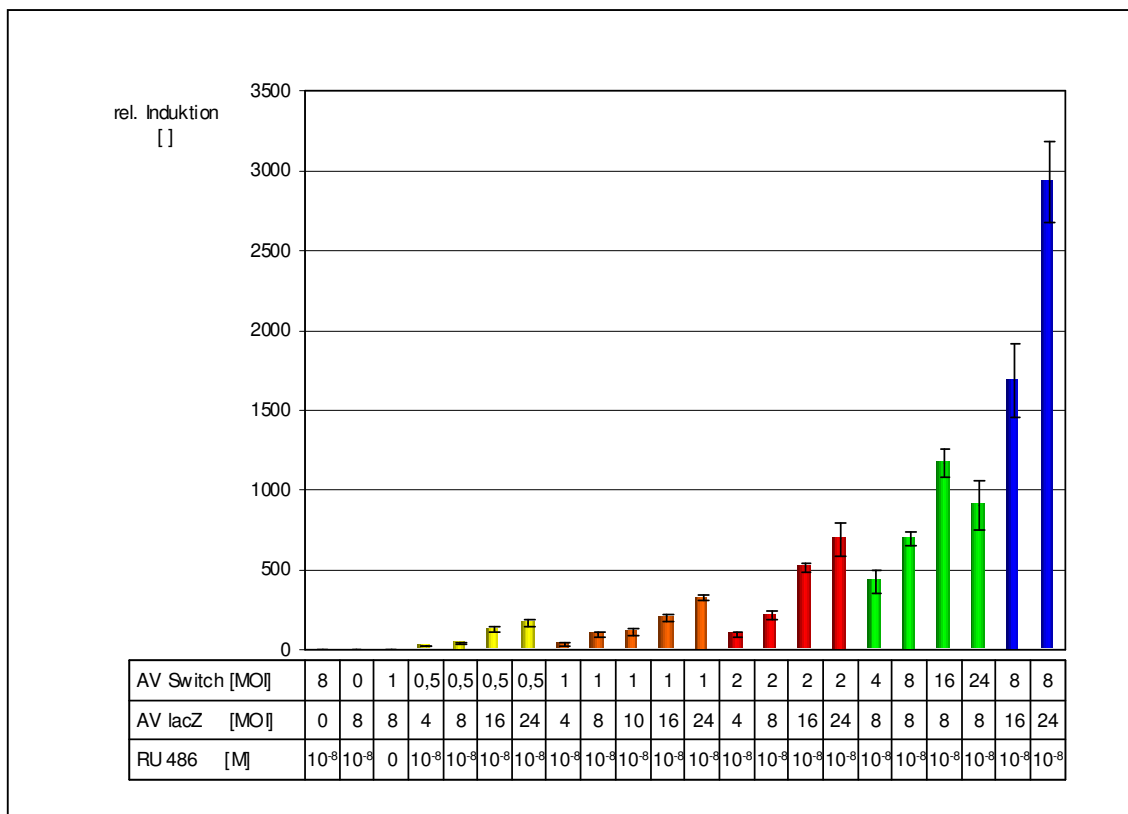


Abbildung 23: Analyse des induzierbaren, viralen Expressionssystems in Kardiomyozyten (Lumineszenzassay)

Primäre Kardiomyozyten wurden mit rekombinanten Adenoviren AV pKA-Switch zur Expression des Transkriptionsfaktors und rekombinanten Adenoviren AV pKA3-lacZ zur regulierbaren Expression der β -Galaktosidase infiziert. Nach Induktion mit 10^{-8} M Mifepriston (RU 486) wurde eine zum Virustiter proportionale Expression der β -Galaktosidase detektiert. Eine basale Aktivität des Systems wurde nicht festgestellt. Alle Werte der β -Galaktosidase-Expression wurden relativ zum Ansatz [AV pKA-Switch, MOI 1, AV pKA3-lacZ MOI 8] dargestellt. (n = 6)

Fehlerbalken = Standardabweichung

Die primären Kardiomyozyten zeigten während der *in vitro* Kultivierung eine stark heterogene Morphologie sowie eine hohe Variabilität des rekombinanten Fluoreszenzsignals, wodurch die Qualität der morphologischen Analyse der Zellen verringert wurde. Durch Supplementation der Kardiomyozyten mit dem hypertrophen Agens Phenylephrin (PE) konnte dieses Manko jedoch ausgeglichen werden. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden die Zellen daher mit 100 μ M PE stimuliert. Durch die Steigerung der Proteinbiosyntheserate und Homogenisierung der Morphologie wurde eine standardisierte Auswertung morphologischer Alterationen ermöglicht. Das virale Expressionssystem wurde unter diesen Bedingungen getestet. Auch bei PE-Stimulation war keine Basalaktivität erkennbar.

Die Werte der β -Galaktosidaseexpression korrelierten erneut mit der Virusmenge. Da die absoluten Werte der Proteinexpression nun um den Faktor 5 erhöht waren, führten bereits Virusmengen \geq MOI 8 für AV pKA-Switch zu artifizieller Zellmorphologie und zu einer Abnahme des Signals der β -Galaktosidase. Abbildung 24 stellt diese Daten als Säulendiagramm dar.

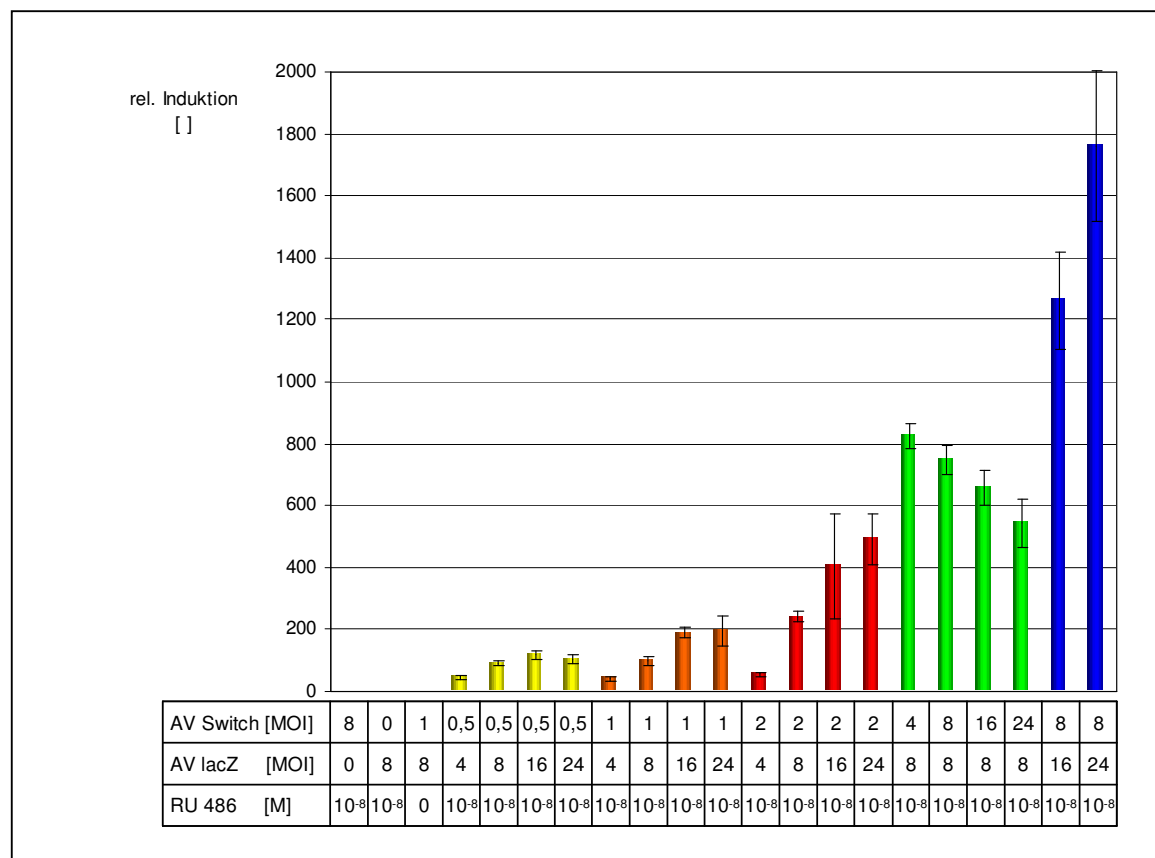


Abbildung 24: Analyse des induzierbaren, viralen Expressionssystems in Kardiomyozyten, supplementiert mit 100 μ M Phenylephrin (Lumineszenzassay)

Primäre Kardiomyozyten wurden mit Adenoviren AV pKA-Switch zur Expression des Transkriptionsfaktors und Adenoviren AV pKA3-lacZ zur regulierbaren β -Galaktosidase-Expression infiziert. Nach Induktion mit 10^{-8} M Mifepriston (RU 486) wurde eine β -Galaktosidase-Expression proportional zum Virustiter detektiert. Erst Virustiter \geq MOI 8 für AV pKA-Switch führten zu einer artifiziellen Verringerung der Expression. Eine basale Aktivität des Systems wurde nicht festgestellt. Alle Werte der β -Galaktosidase-Expression wurden relativ zum Ansatz [AV pKA-Switch, MOI 1, AV pKA3-lacZ MOI 8] dargestellt. (n = 6)

Fehlerbalken = Standardabweichung

1.2.2.2. Abhängigkeit der Expression von der Mifepriston-Konzentration

Um die Abhängigkeit der Expression rekombinanter Proteine von der Dosis des Induktors Mifepriston zu untersuchen, wurden weitere Testexperimente durchgeführt. Kardiomyozyten wurden mit den Adenoviren AV pKA3-lacZ (MOI 20) und AV pKA Switch (MOI 8) infiziert und die Transkription des β -Galaktosidasegens durch ansteigende Konzentrationen von Mifepriston (RU486) induziert, siehe Abbildung 25. Es zeigte sich eine sigmoidale Abhängigkeit der Expression, die ihr Plateau bei $\approx 10^{-8.5}$ M Mifepriston erreichte. Erst bei RU486-Konzentrationen $> 10^{-6}$ M nahm das β -Galaktosidase-Signal ab. Eine zu starke Expression des Transkriptionsfaktors führte hier zu artifiziellen morphologischen Effekten.

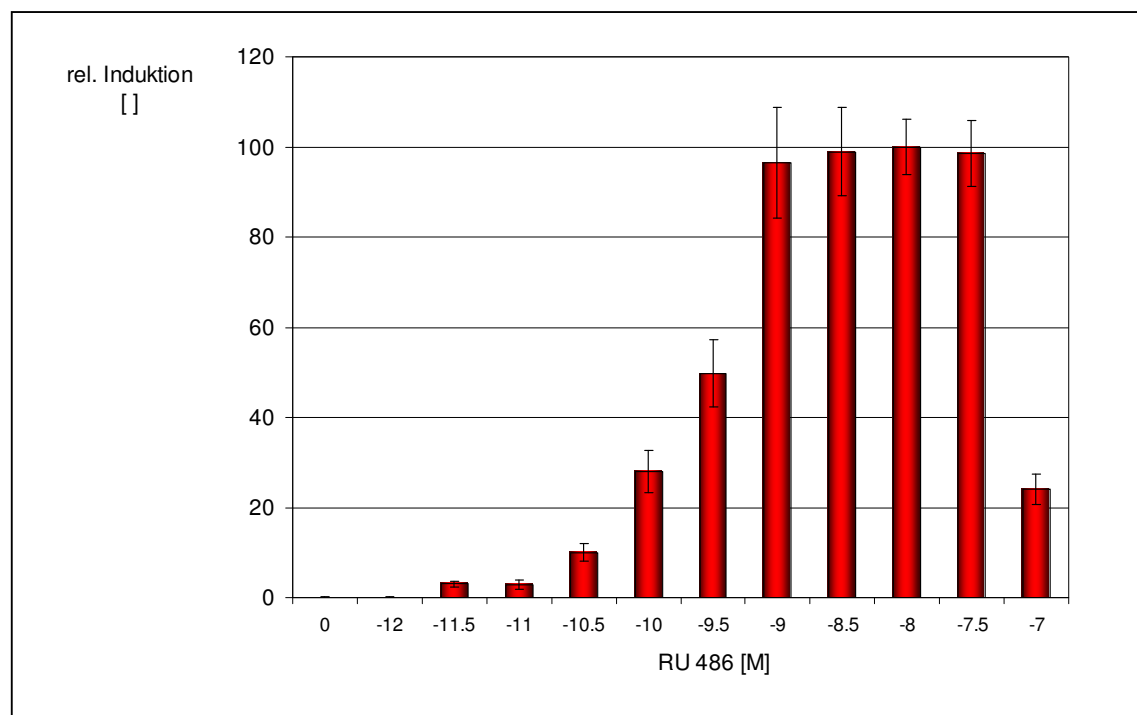


Abbildung 25: Induzierbarkeit des β -Galaktosidase-Gens bei ansteigenden Mifepriston-Konzentrationen (Lumineszenzassay)

Primäre Kardiomyozyten wurden mit Adoviren AV pKA-Switch (MOI 8) zur Expression des Transkriptionsfaktors und mit Adoviren AV pKA3-lacZ (MOI 20) zur regulierbaren β -Galaktosidase-Expression infiziert. Die β -Galaktosidase-Expression war von der Mifepriston-Dosis abhängig und erreichte ab $10^{-8.5}$ M RU486 ihr Plateau. (n = 6)

Fehlerbalken = Standardabweichung

Die Ergebnisse des Lumineszenzassays konnten auch im Western-Blot der Abbildung 26 bestätigt werden. Die Expression wurde hier durch spezifischen Nachweis des β -Galaktosidase-YFP-Fusionsproteins (AV pKA4-lacZ-YFP) detektiert. Im Vergleich zum Lumineszenzassay war der Western-Blot weniger sensitiv. Erst ab 10^{-8} M RU486 war ein β -Galaktosidase-Signal erkennbar. Bei Erhöhung der RU486-Konzentration bis 10^{-6} M stieg das Signal weiter an.

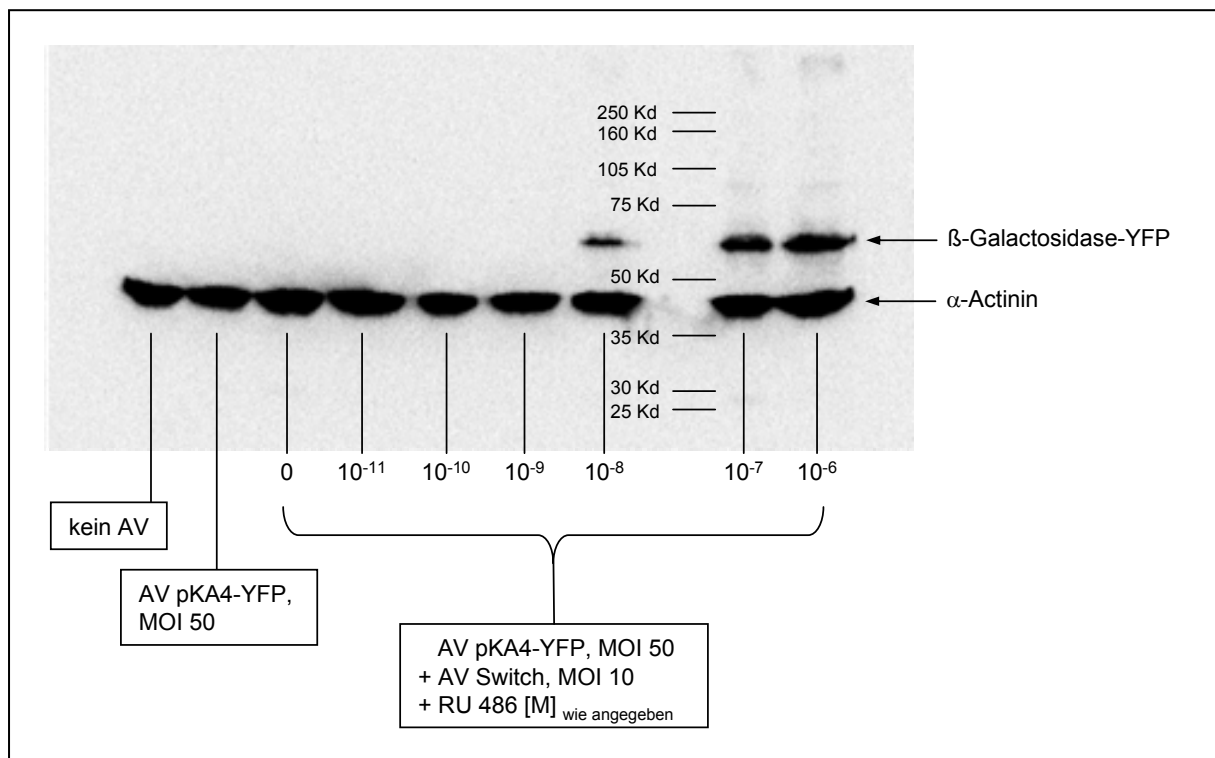


Abbildung 26: Induzierbarkeit des β -Galaktosidase-Gens bei ansteigenden Mifepriston-Konzentrationen (Western Blot)

Primäre Kardiomyozyten wurden mit Adenoviren AV pKA-Switch (MOI 8) zur Expression des Transkriptionsfaktors und mit Adenoviren AV pKA4-lacZ (MOI 20) zur regulierbaren β -Galaktosidase-Expression infiziert. Die β -Galaktosidase-Expression war von der Mifepristonkonzentration abhängig. Die β -Galaktosidase wurde als YFP-Fusionsprotein detektiert. Das sarkomere α -Actinin wurde als Standard zur Proteinquantifizierung eingesetzt.

1.2.2.3. Zeitabhängigkeit der Expression

Als weiterer Parameter des induzierbaren Expressionssystems wurde die Enzymaktivität der rekombinanten β -Galaktosidase in Abhängigkeit von der Induktionsdauer analysiert.

Hierzu wurden primäre Kardiomyozyten mit den Adenoviren AV pKA3-lacZ (MOI 20) und mit AV pKA Switch (MOI 8) infiziert. Nach Induktion des induzierbaren Promotors mit 10^{-8} M RU486 wurde die β -Galaktosidase-Expression im Zeitintervall von 0 bis 72 h bestimmt. Bis zu einer Zeitdauer von 60 h stieg die Proteinmenge exponentiell an. Bei längerer Inkubationsdauer sank die Proteinkonzentration stark ab. In diesem Fall wurden im Mikroskop artifizielle Zellmorphologien festgestellt. Eine Kultivierung der Kardiomyozyten in Anwesenheit von 100 μ M Phenylephrin erhöhte zwar die absolute Menge der β -Galaktosidase, hatte aber keinen Einfluss auf den Zeitpunkt der maximalen Expression. Abbildung 27 verdeutlicht die zeitabhängige Induktion des regulierbaren Expressionssystems.

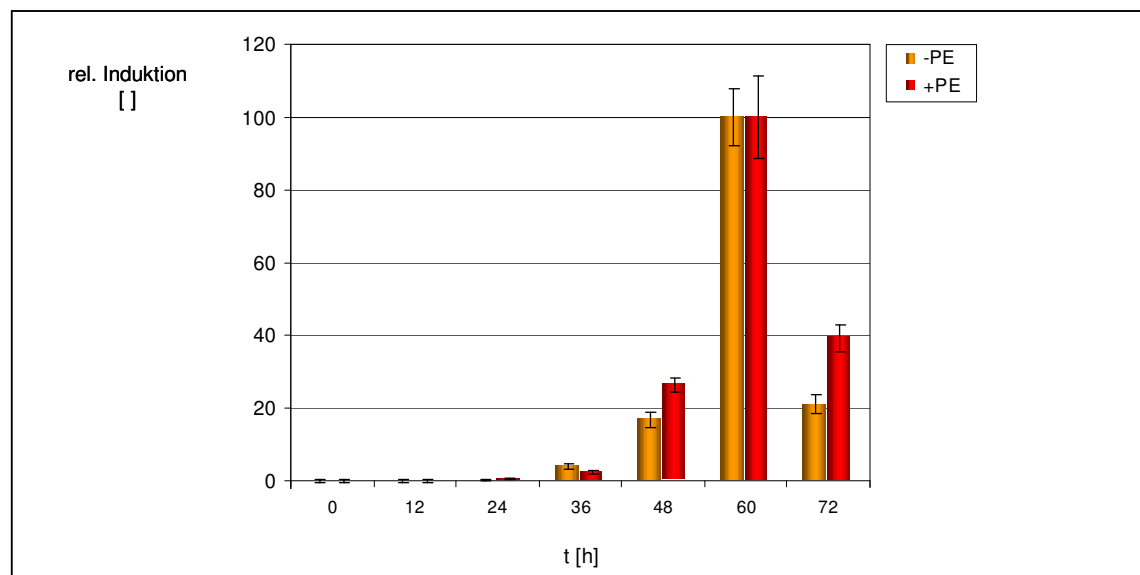


Abbildung 27: Abhängigkeit des β -Galaktosidase-Signals von der Induktionsdauer (Lumineszenzassay)

Primäre Kardiomyozyten wurden mit Adenoviren AV pKA-Switch (MOI 8) zur Expression des Transkriptionsfaktors und mit Adenoviren AV pKA3-lacZ (MOI 20) zur regulierbaren β -Galaktosidase-Expression infiziert. Die Transkription wurde mit 10^{-8} M RU 486 induziert. Das maximale Expressionssignal war nach 60 h zu detektieren. (n = 6)

Fehlerbalken = Standardabweichung

Das virale Expressionssystem ermöglichte folglich eine kontrollierte Induktion der cDNA-Transkription für die durchzuführende Expressionsklonierung. Auf Grund der dargestellten Ergebnisse wurden die Kardiomyozyten während des Screeningverfahrens in Anwesenheit von 100 μ M Phenylephrin kultiviert, um die Proteinbiosyntheserate zu steigern und die Detektion der ebenfalls verstärkt exprimierten YFP- und CFP-Kontrollproteine zu erleichtern. Um artifizielle Morphologieeffekte der Kardiomyozyten zu vermeiden, wurden im späteren Assay Virusmengen $< \text{MOI } 30$ für pKA3 und Virusmengen $< \text{MOI } 8$ für das Virus pKA-Switch eingesetzt. Die rekombinante Expression wurde mit 10^{-8} M Mifepriston induziert und die Zellen nach 60 h analysiert.

1.2.3. Rekombinante Adenoviren zur Expression toxischer Proteine

Voraussetzung für die Expressionsklonierung war es, eine cDNA-Bibliothek in rekombinante Adenoviren zu integrieren. Um eine Virusbank zu erhalten, die sowohl quantitativ als auch qualitativ der cDNA-Ausgangszusammensetzung entsprach, musste während der Generierung der rekombinanten Adenoviren die Anzahl und Redundanz der spezifischen cDNAs konstant bleiben. Dieser Anspruch konnte nur erfüllt werden, wenn während der Verpackung und Amplifikation der rekombinanten Viruspartikel keine Transkription der cDNAs erfolgte. Andernfalls würden exprimierte cDNAs für toxische Nukleinsäuren und Proteine die Produktion der entsprechenden Viren behindern und somit die Zusammensetzung der cDNA-Bank im viralen System modifizieren. Der regulierbare Promotor des für diese Anwendung entwickelten viralen Vektorsystems pKA3 durfte daher während der Adenovirusproduktion in HEK-293 Zellen keine Basalaktivität aufweisen.

Um die Effizienz des regulierbaren Adenovirussystems pKA3 zu testen, wurden daher spezifische cDNAs untersucht, deren Genprodukte die potenzielle Toxizität von Proteinen der cDNA-Bibliothek imitierten und die Virusproduktion inhibierten. Es wurde die Nukleinsäuresequenz des Fusionskonstrukts aus RNase T1 und RNase III, die einen zytotoxischen Effekt auf die Verpackungszelllinie ausüben, sowie das Gen des viralen Spleißfaktors, der die Verpackung der Viruspartikel inhibiert, kloniert (Fujii et al., 1995), (Edholm et al., 2001; Molin und Akusjarvi, 2000).

Um den toxischen Effekt der Proteine während der Virusproduktion zu kontrollieren, wurden zunächst beide Konstrukte in das Virusplasmid pKA2 mit konstitutiver Expressionskassette integriert. Nach Transformation von HEK-Zellen mit den Plasmiden wurde die Verpackung der entsprechenden rekombinanten Adenoviren untersucht. Zusätzlich diente das Plasmid pKA2-YFP (konstitutive Expression von YFP) als Positivkontrolle der Virusgenerierung. Nach 12 Tagen zeigten nur die mit YFP-Kontrollplasmid transfizierten HEK-Zellen Merkmale einer erfolgreichen Virusverpackung. Die Zellen begannen sich abzurunden und nach Lyse neue Viruspartikel freizusetzen, so dass im Zellrasen Bereiche sekundär infizierter

Zellen sichtbar wurden. Die rekombinanten Viren konnten nachfolgend zur Amplifikation in HEK-Zellen eingesetzt werden.

Die für RNase und ASF kodierenden rekombinanten Adenovirusplasmide konnten hingegen nicht in Viruspartikel verpackt werden. Das Fluoreszenzsignal des vom zweiten Cistron kodierten CFP-Proteins nahm stetig ab, nach zwei Wochen begannen die Zellen abzusterben. Dieser Effekt begründete sich in der zytotoxischen Wirkung der konstitutiv exprimierten RNase bzw. im die Virusverpackung inhibierenden Effekt des Spleißfaktors. Die entsprechenden Fluoreszenzaufnahmen der HEK-Zellen werden in der Abbildung 28 dargestellt.

Nachdem sich somit die Herstellung der Adenoviruspartikel bei konstitutiver rekombinanter Expression als ungeeignet erwiesen hatte, wurde das induzierbare Expressionssystem pKA3 unter vergleichbaren Bedingungen untersucht. Das Gen der RNase und des Spleißfaktors ASF wurden in das induzierbare Expressionssystem pKA3 integriert. Auch hier wurde als Positivkontrolle das entsprechende rekombinante Adenovirusgenom zur induzierbaren Expression des YFP-Gens (pKA3-YFP) hergestellt. Nach Lipofektion von HEK-Zellen konnten nun alle drei Konstrukte innerhalb von 12 Tagen in Adenoviruspartikel verpackt werden. Die transfizierten Zellen wurden hierbei durch das vom zweiten Cistron konstitutiv exprimierte CFP-Protein im Fluoreszenzmikroskop identifiziert. Abbildung 29 zeigt die Aufnahmen der HEK-Zellen.

Auch die anschließende Amplifikation der gereinigten Adenoviren in HEK-Zellen erwies sich nach Titerbestimmung (Methode der Endpunkt-Verdünnung) als erfolgreich.

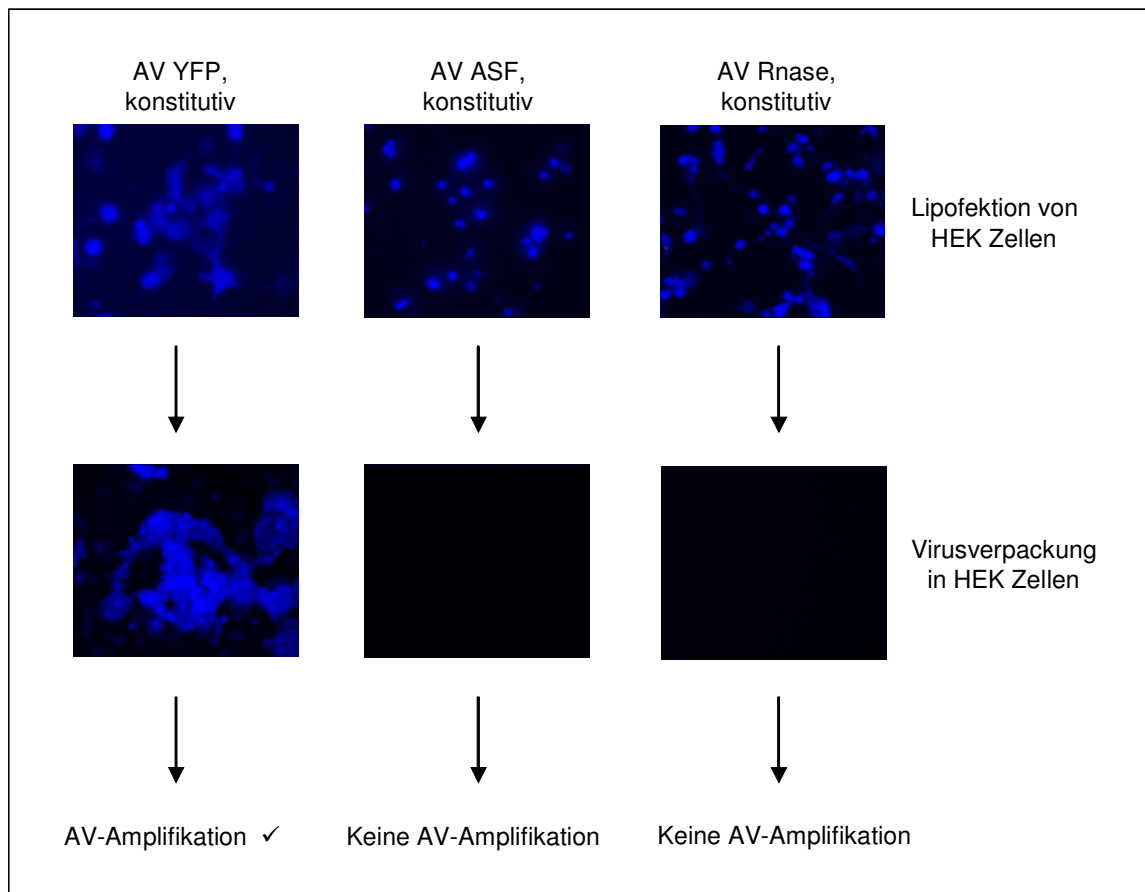


Abbildung 28: Verpackung von cDNAs im konstitutiven Expressionssystem pKA2 (Transfektion von HEK-Zellen)

HEK-Zellen wurden mit rekombinanten Adenovirusplasmiden pKA2 zur konstitutiven Expression von YFP, RNase bzw. des Spleißfaktors ASF transfiziert. Die Expression von ASF bzw. RNase inhibierte die Virusproduktion. Nur die Verpackung des Kontrollkonstrukts YFP resultierte in der Produktion rekombinanter Adenoviren. Die transfizierten Zellen wurden anhand des CFP-Markerproteins detektiert.

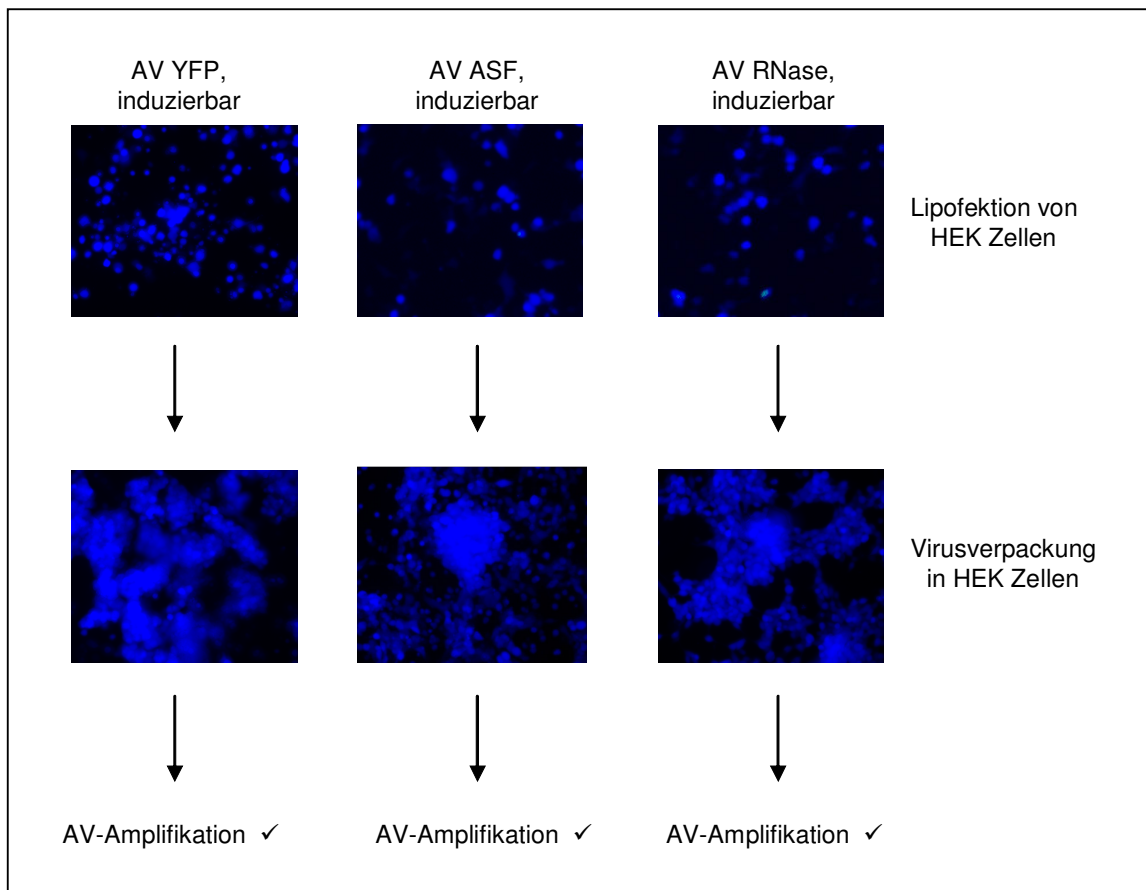


Abbildung 29: Verpackung von cDNAs im induzierbaren Expressionssystem pKA3 (Transfektion von HEK-Zellen)

HEK-Zellen wurden mit rekombinanten Virusplasmiden pKA3 zur induzierbaren Expression von YFP, RNase bzw. des Spleißfaktors ASF transfiziert. Im nicht induzierten Zustand konnten alle Konstrukte in rekombinante Adenoviren verpackt und diese anschließend amplifiziert werden. Die transfizierten Zellen wurden anhand des CFP-Markerproteins detektiert.

Die Viren sowohl zur konstitutiven als auch zur induzierbaren Expression von YFP (AV pKA2-YFP, AV pKA3-YFP) ergaben vergleichbare Titer. Rekombinant exprimiertes YFP hatte folglich keinen Einfluss auf den Prozess der Virusproduktion. Adenoviren mit rekombinanten Genen, deren exprimierte Proteine die Virusproduktion inhibierten (RNase und ASF), konnten hingegen nur mit dem induzierbaren viralen Expressionssystem AV pKA3 hergestellt werden. Im nicht induzierten Zustand konnten auf diese Weise Virustiter erzielt werden, die mit denen von AV pKA2-YFP und AV pKA3-YFP vergleichbar waren. Diese Daten werden in Abbildung 30 als Säulendiagramm aufgeführt.

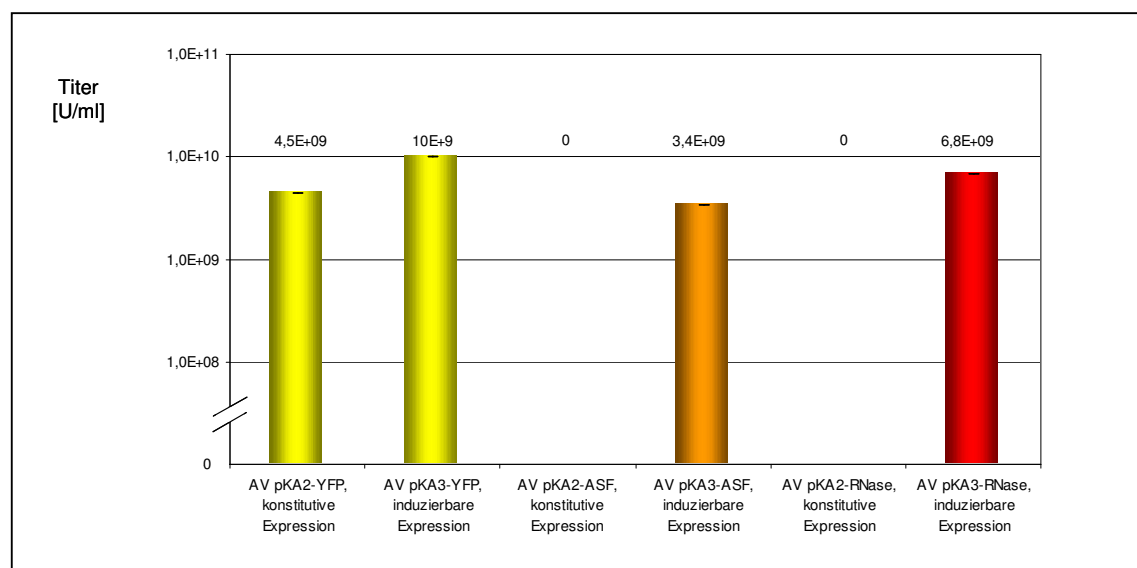


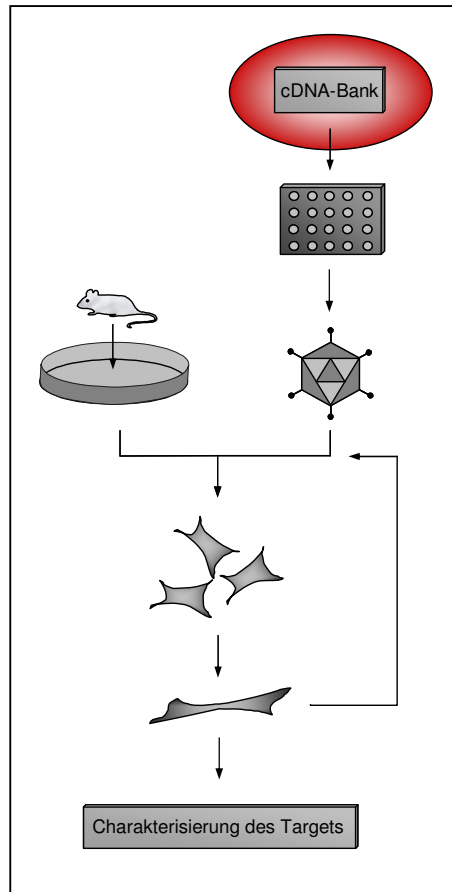
Abbildung 30: Titerbestimmung amplifizierter, rekombinanter Adenoviren (Methode der Endpunkt-Verdünnung)

Rekombinante Adenoviren AV pKA3 zur induzierbaren Expression der toxischen Proteine RNase und ASF wurden im nicht induzierten Zustand amplifiziert. Ihre Titer waren vergleichbar mit denen der Kontrollviren zur Expression von YFP (AV pKA2-YFP, AV pKA3-YFP). Die Viren AV pKA2-RNase und AV pKA2-ASF konnten hingegen nicht generiert werden, da die konstitutiven exprimierten rekombinanten Proteine die Virusproduktion inhibierten.

Eine repräsentative Verpackung und Amplifikation von cDNAs in Adenoviren konnte somit nur im induzierbaren Expressionssystem des Virus AV pKA3 erfolgen. Dieses System erlaubte es, rekombinante Viren unabhängig von der potenziellen Toxizität ihrer cDNAs in HEK-Zellen zu amplifizieren und vergleichbare Titer für alle Viren zu erzielen.

Der Einsatz des Expressionssystems zur Generierung einer normalisierten cDNA-Bank in rekombinanten Adenoviren wird im nachfolgenden Abschnitt „Ergebnisse 2.“ beschrieben.

2. Normalisierte cDNA-Bank des humanen Herzens



Eine auf den Transkripten des humanen Herzens basierende cDNA-Bank wurde produziert, um Genprodukte zu identifizieren, die kausal an der Entstehung und Progression der Herzinsuffizienz beteiligt sind. Hierzu wurde Gewebe des gesunden und des erkrankten Herzens verwendet.

Bei der Herstellung einer cDNA-Bibliothek wird die variable Genaktivität der Zellen je nach Typ, Differenzierungsstatus oder Pathogenese konserviert. Für eine ideale Expressionsklonierung muss jedoch die Anzahl der cDNAs pro Gen möglichst homogen sein. Dies ermöglicht eine hohe Zahl unterschiedlicher cDNAs in der Bibliothek, die mit gleicher Wahrscheinlichkeit im Assay exprimiert und analysiert werden können.

Um diesem Aspekt Rechnung zu tragen, wurde eine Normalisierung der cDNA-Bank vorgenommen. Hierdurch sollte die Anzahl der überdurchschnittlich in der Bank vorhandenen cDNAs verringert und gleichzeitig unterrepräsentierte cDNAs angereichert werden. Die Herstellung und Normalisierung der cDNA-Bank aus RNA-Proben der MediGene AG wurde von der Firma Invitrogen durchgeführt. Die Methoden wurden im internationalen Patent WO 99 / 15702 veröffentlicht.

2.1. Microarray- und Sequenzanalysen der cDNA-Bank

Die Qualität der Normalisierung wurde in DNA-Microarray-Experimenten überprüft. Hierfür wurden die Transkripte der Herz-cDNA-Bibliothek vor und nach der Normalisierung mit einem DNA-Chip (U95A, Oligonukleotid-Array zur Detektion von 12.000 bekannten, humanen Genen, Affymetrix) hybridisiert.

Der statistische Vergleich der Hybridisierungssignale der Microarrays bewies, dass infolge der Normalisierung das maximale Signal hoch redundanter Transkripte reduziert worden war und zugleich neue, schwache Signale von zuvor nicht detektierbaren Transkripten erschienen. Die Auswertung wird in Form eines so genannten Box-Plots (siehe zur Definition auch Ergebnisse 4.1.1.) in der Abbildung 31 dargestellt.

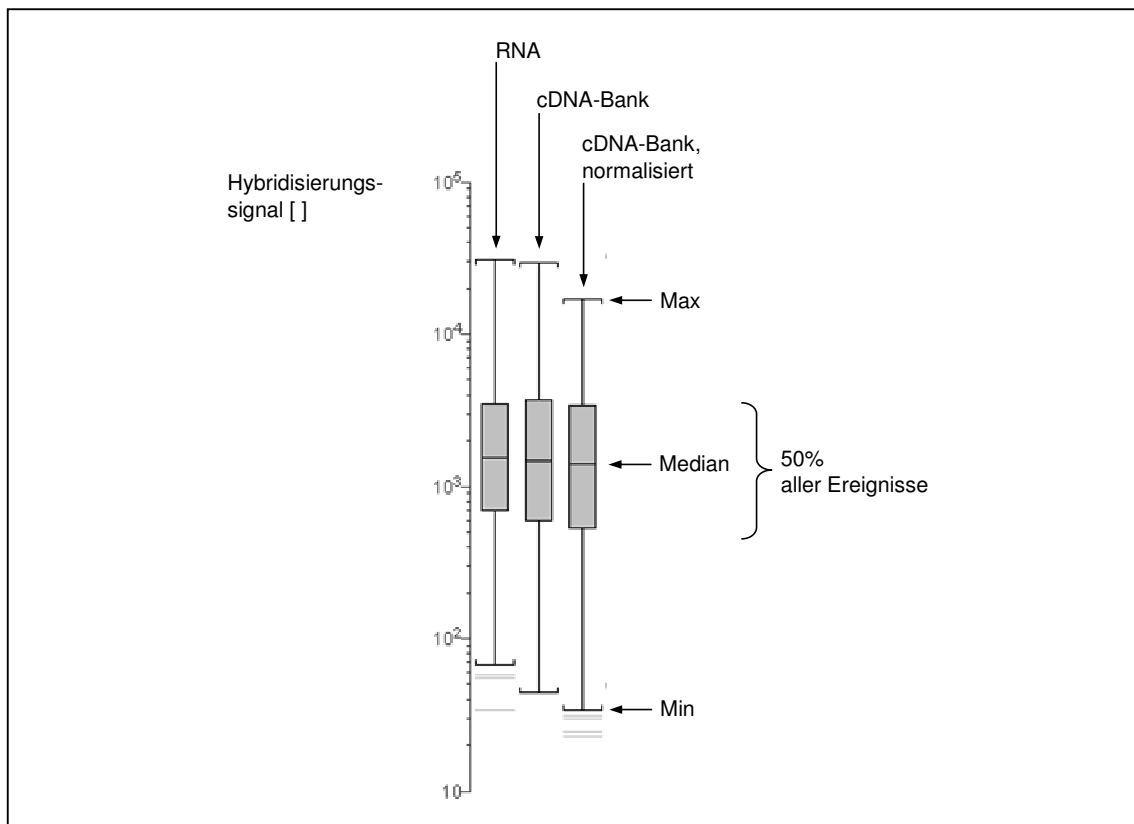


Abbildung 31: Statistische Analyse der Normalisierung der cDNA-Bank (cRNA-Microarray-Hybridisierung)

cRNAs der aus humanem Herzgewebe hergestellten cDNA-Bank wurden vor und nach der Normalisierung mit den Nukleinsäuren eines DNA-Microarrays hybridisiert. Nach der Normalisierung war das von hoch redundanten Transkripten verursachte maximale Signal reduziert. Gleichzeitig waren neue, minimale Signale zu erkennen. Diese wurden durch angereicherte Transkripte verursacht, die vor der Normalisierung nicht detektierbar waren.

Die detaillierte Auswertung des Microarrays zeigte, dass durch die Normalisierung etwa 800 der 5.700 detektierten Transkripte selektiv angereichert wurden. Die Stärke der entsprechenden Hybridisierungssignale auf dem DNA-Microarray, welche sich proportional zur Anzahl der Transkripte pro Gen verhielt, wurde durch die Normalisierung bis zu einem Faktor 100 erhöht. Die Sequenzanalyse der Chipdaten ergab, dass es sich hierbei unter anderem um cDNAs für Transkriptionsfaktoren wie GATA2, Kinasen der MAPK-Kaskade (z. B. ERK6) oder Proteine der extrazellulären Matrix (z. B. Metallomatrixprotease 21) handelte. Diese Transkripte waren vor der Normalisierung der cDNA-Bibliothek unterrepräsentiert. Die Daten zur Anreicherung spezifischer Transkripte werden in Abbildung 32 dargestellt.

Circa 140 hochredundante Transkripte wurden hingegen durch die Normalisierung der cDNA-Bibliothek in ihrer Anzahl pro Gen reduziert. Die mit den Transkripten korrelierenden Hybridisierungssignale des DNA-Microarrays wurden nach Normalisierung bis zu einem Faktor 100 verringert. Die entsprechenden cDNAs kodierten unter anderem für essentielle Proteine des Zellmetabolismus (z. B. GAPDH), mitochondriale Proteine (z. B. ATP-Synthase) oder ubiquitär exprimierte Proteine, wie Hitzeschockproteine (z. B. HSP 70). Die Microarrayanalysen der durch Normalisierung abgereicherten Transkripte werden in Abbildung 33 gezeigt.

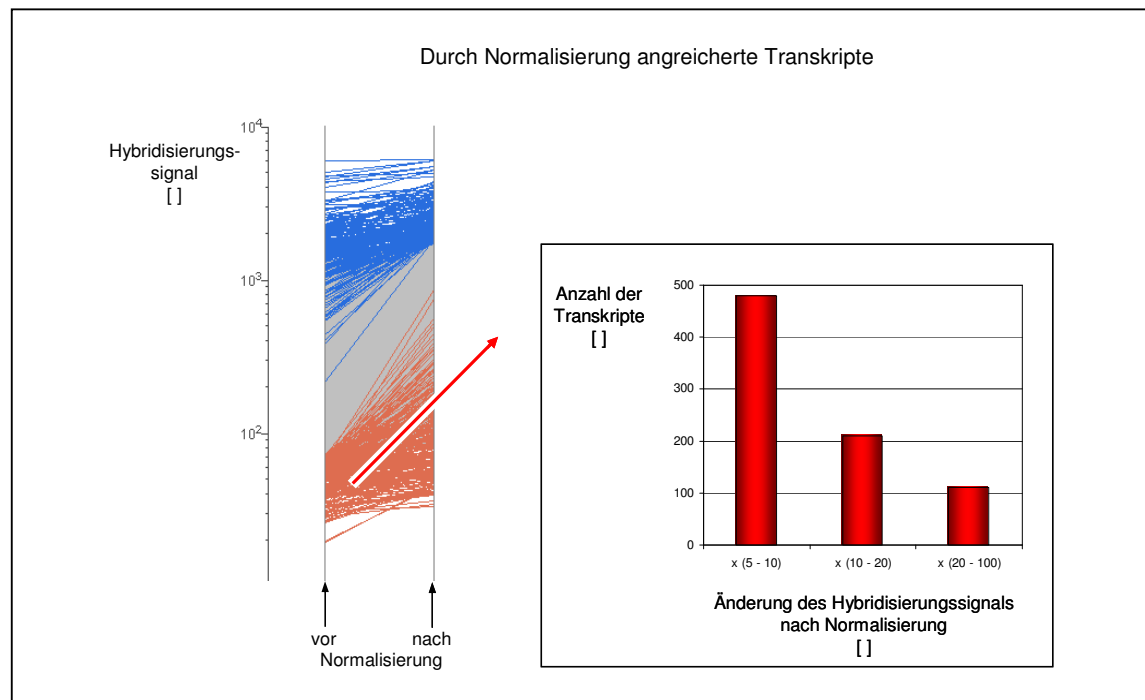


Abbildung 32: Anreicherung spezifischer Transkripte der cDNA-Bank durch Normalisierung (cRNA-Microarray-Hybridisierung)

Von der cDNA-Bank transkribierte RNAs wurden vor und nach der Normalisierung mit den Gensonden eines DNA-Microarrays hybridisiert. Die linke Graphik stellt die angereicherten spezifischen Transkripte nach Normalisierung und die daraus resultierende Zunahme der Hybridisierungssignale dar. Detaillierte Analysen, abgebildet im rechten Säulendiagramm, zeigen die selektive Anreicherung von circa 800 unterrepräsentierten Transkripten. Ihre Hybridisierungssignale wurden bis zu einem Faktor 100 erhöht.

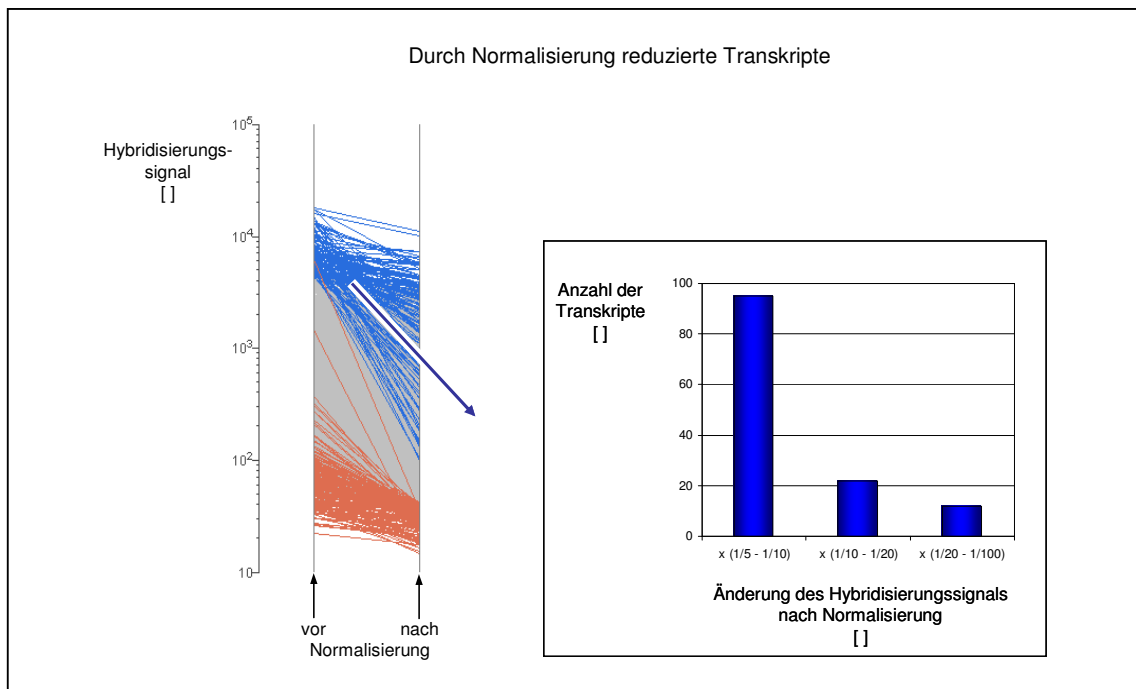


Abbildung 33: Abreicherung spezifischer Transkripte der cDNA-Bank durch Normalisierung (cRNA-Microarray-Hybridisierung)

Von der cDNA-Bank transkribierte RNAs wurden vor und nach der Normalisierung mit den Sonden eines DNA-Microarrays hybridisiert. Die linke Graphik stellt die abgereicherten spezifischen Transkripte nach Normalisierung und die daraus resultierende Reduktion der Hybridisierungssignale dar. Detaillierte Analysen, abgebildet im rechten Säulendiagramm, zeigen die selektive Reduktion von etwa 140 überrepräsentierten Transkripten. Ihre Hybridisierungssignale wurden bis zu einem Faktor 100 verringert.

Während der Generierung der normalisierten Bank wurden die cDNAs in mehrere Vektorsysteme integriert. Auch hier wurden alle Schritte der Produktion durch Microarray-Experimente quantitativ kontrolliert. Eine erste Hybridisierung der aus dem humanen Herzen isolierten Transkripte mit dem DNA-Chip U95A (Affymetrix) zeigte, dass 48 % der 12.000 ausgewählten humanen Gene im Herz transkribiert worden waren.

Um einen effizienten Transfer der cDNAs in unterschiedliche Vektoren zu ermöglichen, wurden sie zwischen den flankierenden Nukleotidsequenzen des Rekombinationssystems (Gateway-System, Invitrogen) in den Vektor pCMV6 integriert. Entsprechend wurden auch in die nachfolgend benötigten Vektorsysteme die korrespondierenden Nukleinsäuresequenzen zur Rekombination mit den cDNAs eingesetzt.

Die cDNAs wurden zunächst im Vektor pCMV6 normalisiert. Auf Grund der Anreicherung unterrepräsentierter cDNAs nahm dabei die Anzahl der auf dem DNA-Chip detektierten Gene um 10 % zu. Die cDNAs wurden danach mit dem Eingangsvektor pDONR212 rekombiniert. Hierbei handelte es sich um eine Rekombination der attB / attP Nukleotidsequenzen des Gateway-Systems (Invitrogen), welche zum Verlust von 14 % der cDNAs führte. Die Integration in den Vektor pDONR212 war jedoch notwendig, da dieser eine universelle Rekombination mit allen auf dem Gateway-System basierenden Expressionsvektoren ermöglichte. So wurde abschließend die normalisierte cDNA-Bank unter anderem mit dem viralen Vektorsystem pKA3 rekombiniert (siehe „Ergebnisse 2.2“). Diese Rekombinationsreaktion der attL / attR Nukleotidsequenzen des Gateway-Systems erwies sich als sehr effektiv, der Verlust von cDNA-Klonen betrug nur 2 %. Die Ergebnisse werden in Abbildung 34 dargestellt.

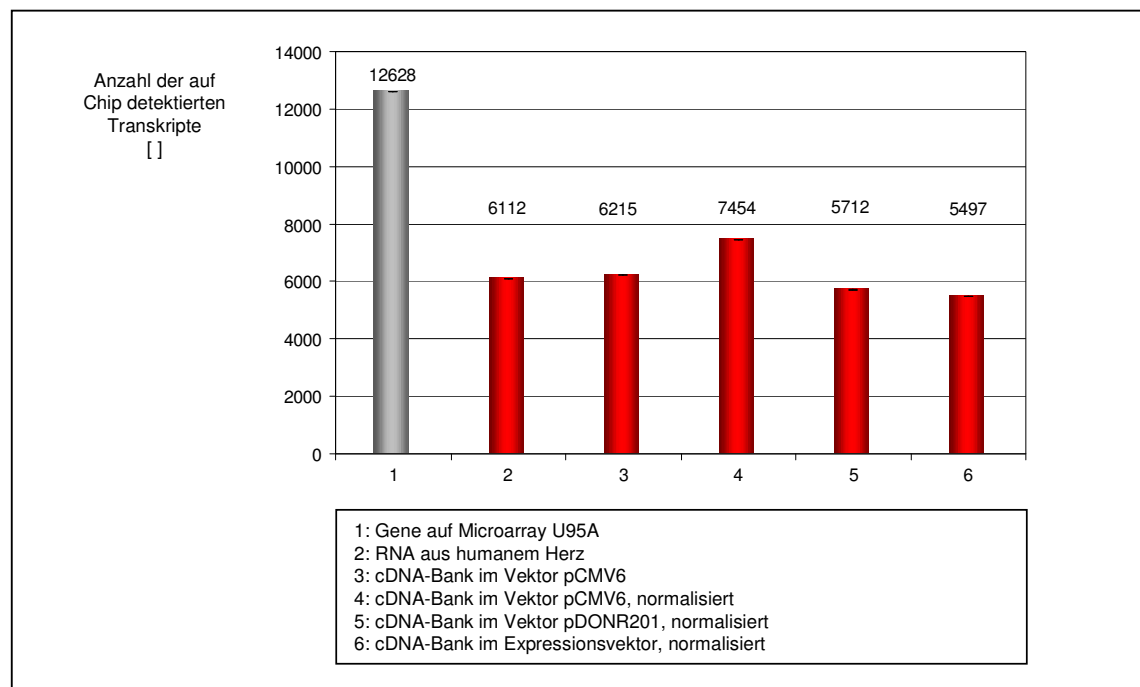


Abbildung 34: Herstellung der cDNA-Bank in verschiedenen Vektorsystemen (cRNA-Microarray-Hybridisierung)

Während der Produktion der Genbank wurden die cDNAs über homologe Rekombination (Gateway-System, Invitrogen) in mehrere Vektoren integriert. Nach Normalisierung in pCMV6 wurde die cDNA-Bank mit dem Eingangsvektor pDONR212 rekombiniert. Dieser konnte universell zur Rekombination mit den erforderlichen Expressionsvektoren eingesetzt werden. Während des gesamten Prozesses nahm die Zahl der auf dem Microarray (U95A, 12000 humane Gene, Affymetrix) detektierten Gene nur um 5 % ab. Etwa 48 % der auf dem DNA-Chip vorhandenen Gene wurden im Herz transkribiert, 43 % wurden in die cDNA-Bank im Expressionsvektor integriert.

Neben der Kontrolle der Normalisierung und Rekombination der gesamten cDNA-Bank wurden zusätzlich die Nukleotidsequenzen von mehr als 1.300 cDNA-Einzelklonen bestimmt. Etwa 87 % der cDNA-Sequenzen leiteten sich von unterschiedlichen Genen ab. Die übrigen cDNAs konnten zu Contigs mit überlappenden homologen DNA-Bereichen zusammengesetzt werden. Zum Zeitpunkt der Analyse (09 / 2001, Datenbank und Algorithmus NCBI BLAST®) kodierten 98 % der cDNAs für bekannte Nukleotidsequenzen des humanen Genoms. Für 35 % aller sequenzierten cDNAs war der offene Leseraster des Gens bekannt. Von ihnen kodierte ein Drittel für die vollständige Proteinsequenz des entsprechenden Gens. Die Ergebnisse der Sequenzanalysen zeigt das Fließschema der Abbildung 35.

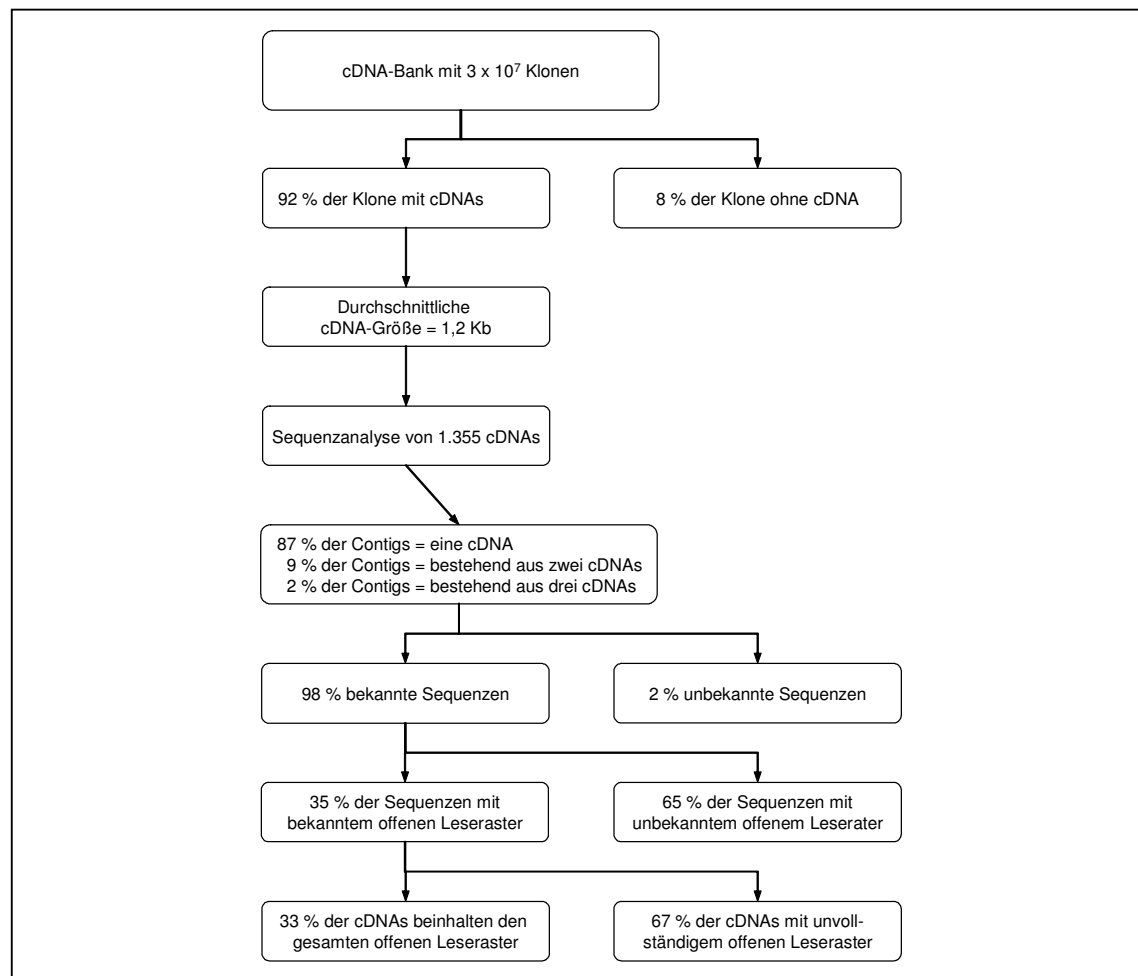


Abbildung 35: DNA-Sequenzanalyse von Klonen der cDNA-Bank

1.355 Nukleotidsequenzen der normalisierten cDNA-Bank wurden analysiert. Nach Datenbankrecherche waren 98 % der Sequenzen bekannt. Ein Drittel der cDNAs mit bekanntem offenem Leseraster kodierten für die Gesamtlänge der Proteinsequenz.

Contig: Contiguous Elements, ein Set von überlappenden DNA-Klonen

Zusätzlich wurde die Bandbreite der in der Genbank vorhandenen cDNA-Größen auf dem Agarosegel dargestellt (siehe Abbildung 36). Die Nukleinsäurelängen variierten zwischen 0,3 bis 3,0 Kb. Die durchschnittliche Länge der cDNAs betrug 1,2 Kb.

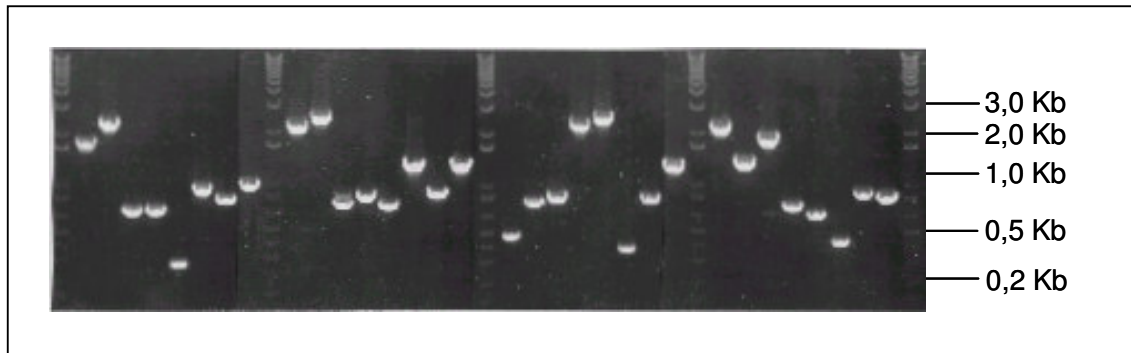


Abbildung 36: DNA-Größenbestimmung von Klonen aus der cDNA-Bank (Auftrennung der DNA im 1prozentigen Agarosegel)

Durch PCR-Methoden wurden 48 Klonen der normalisierten cDNA-Bank (im Expressionsvektor pKA3) amplifiziert. Auf dem Agarosegel wurde die Größenverteilung der Klonen deutlich.

Die umfassenden Microarray- und Sequenzanalysen zeigten folgende Ergebnisse:

- Die cDNA-Bank enthielt eine repräsentative Anzahl der im humanen Herz transkribierten Gene, ein Drittel der Klonen kodierte für den gesamten offenen Leseraster des Gens.
- Durch Normalisierung der Genbank wurde die Homogenität bezüglich der Transkriptanzahl pro Gen deutlich erhöht.
- Die gesamte cDNA-Bank konnte durch homologe Rekombination effizient und verlustarm in Expressionsvektorsysteme integriert werden.

Die normalisierte cDNA-Bank wurde daher zur Expressionsklonierung im viralen Vektorsystem pKA3 eingesetzt.

2.2. cDNA-Pools

Die normalisierte cDNA-Bank sollte in primären Kardiomyozyten exprimiert werden. Wie im Abschnitt „Ergebnisse 1.2.“ beschrieben, war das virale Vektorsystem pKA3 hierfür optimal geeignet. Mehrere Klone der cDNA-Bank sollten gleichzeitig mit dem Vektorsystem pKA3 (a, b, c) rekombiniert und nachfolgend in rekombinante Adenoviren verpackt werden, um den Durchsatz der Expressionsklonierung zu erhöhen. Die so genannten Plasmid- bzw. Adenoviruspools mussten folgende Bedingungen erfüllen:

- Alle cDNA-Klone eines Pools mussten verlustfrei durch homologe Rekombination in das Vektorsystem pKA3 (a, b, c) integriert werden.
- Die Anzahl der Klone eines Pools musste während der Verpackung, Amplifikation und Aufreinigung der rekombinanten Adenoviren konstant bleiben.
- Der relative Anteil einer cDNA im Pool musste ausreichend groß sein, um einen von ihr induzierten morphologischen Effekt in Kardiomyozyten detektieren zu können. Bei einer zu hoch gewählten Poolgröße würden zu wenig Herzzellen mit einer spezifischen cDNA transduziert, um einen statistisch signifikanten Effekt zu erzeugen. Außerdem könnte der potenzielle morphologische Effekt durch Expression der übrigen cDNAs maskiert werden.

Zunächst wurde die Effizienz der Rekombinationsreaktion des Vektors pKA3 überprüft. Anstelle der normalisierten cDNA-Bank wurde das für die bakterielle β -Galaktosidase kodierende Gen im Eingangsvektor pDONR212 mit pKA3 rekombiniert. *E. coli* wurden mit den Plasmiden des Rekombinationsansatzes transformiert und auf Agarplatten inkubiert. Anschließend wurden die Plasmide von 56 Klonen präpariert und eine PCR zur spezifischen Amplifikation der Nukleinsäuresequenz des β -Galaktosidase Gens mit flankierenden Sequenzen des Vektors pKA3 durchgeführt.

Wie die Auftrennung der PCR-Produkte im Agarosegel zeigte, besaßen alle Klone das korrekt in pKA3 integrierte Gen der β -Galaktosidase (siehe Abbildung 37). Wurden die Transformanden auf Agarplatten mit 0,002 % X-Gal inkubiert, zeigten mehr als 98 % der *E. coli*-Kolonien eine Blaufärbung auf Grund der Enzymaktivität der rekombinant exprimierten β -Galaktosidase (siehe Abbildung 38). Die Rekombination eines Gens im Eingangsvektor pDONR212 mit Vektor pKA3 verlief folglich hocheffizient.

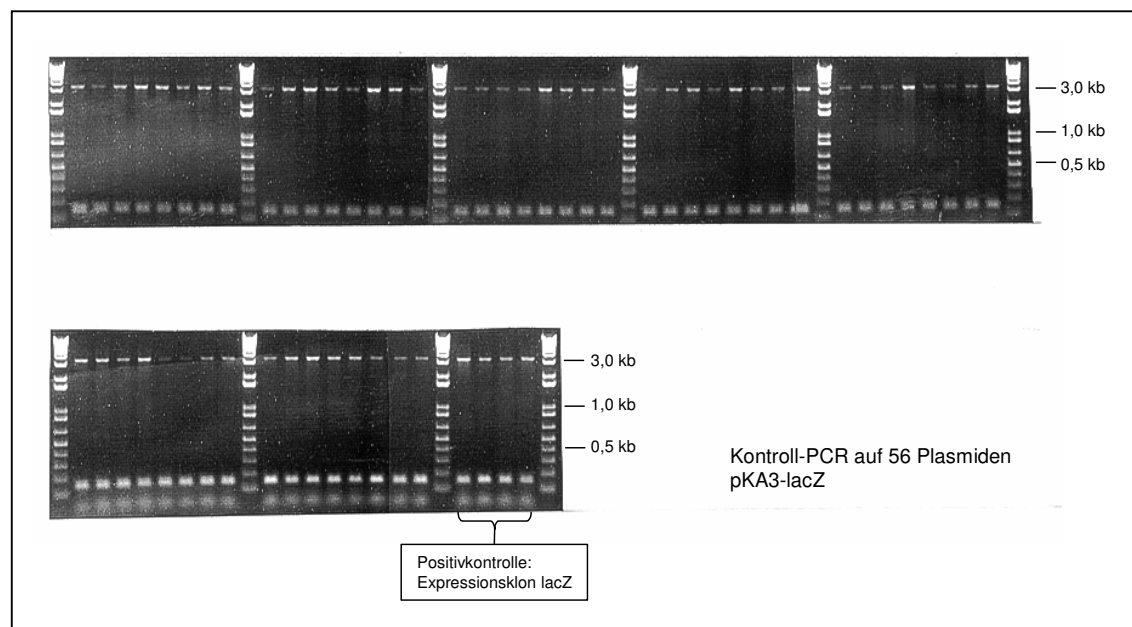


Abbildung 37: Effizienz der Rekombination von pKA3 und pDONR212-lacZ (Auftrennung der DNA im 1prozentigen Agarosegel)

Nach homologer Rekombination des Vektors pKA3 mit dem Eingangsvektor pDONR212-lacZ wurden *E. coli* mit den Plasmiden des Reaktionsansatzes transformiert. Die Plasmide der *E. coli*-Klone wurden präpariert und eine spezifische PCR zur Amplifikation der Nukleinsäuresequenz des β -Galaktosidase Gens mit flankierenden Sequenzen des Vektors pKA3 durchgeführt. Aus allen Klonen konnte das korrekte PCR-Produkt des Vektors pKA3-lacZ amplifiziert werden.

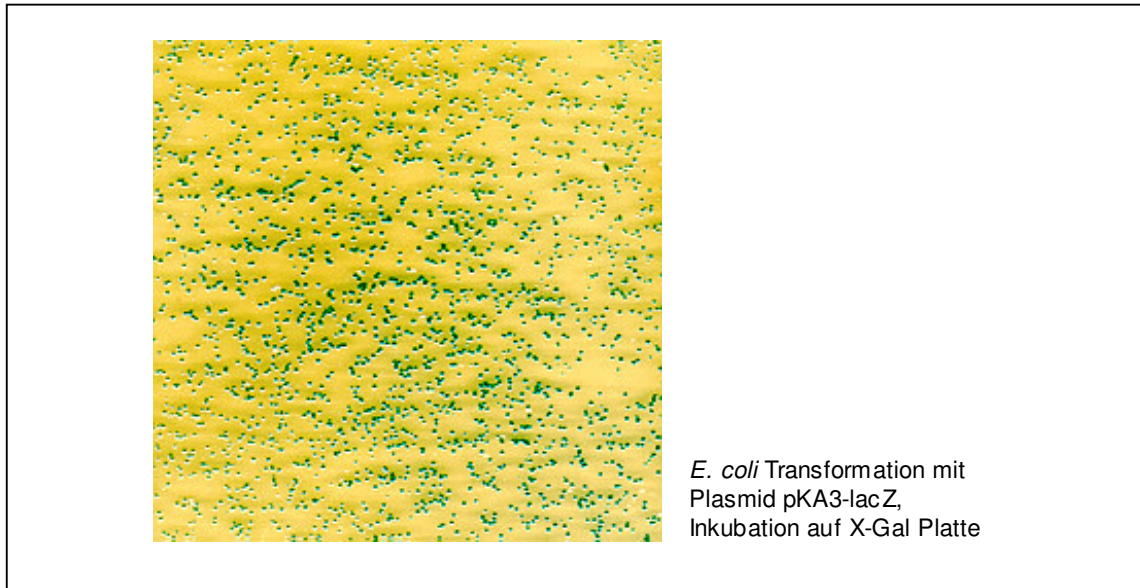


Abbildung 38: Effizienz der Rekombination von pKA3 und pDONR212-lacZ (Inkubation der Transformanten auf Agar + 0,002 % X-Gal)

Nach homologer Rekombination des Vektors pKA3 und Eingangsvektor pDONR212-lacZ wurden *E. coli* mit den Plasmiden des Reaktionsansatzes transformiert. Inkubation auf Agarplatten mit X-Gal zeigte, dass mehr als 98 % aller Klone das aktive Gen der β -Galaktosidase im Vektor pKA3 besaßen.

Auch die gleichzeitige Rekombination verschiedener cDNAs in pDONR212 mit dem Expressionsvektor pKA3 war erfolgreich. Es wurden Rekombinationen von cDNA-Banken bestehend aus 48, 96 bzw. 384 bekannten Klonen mit pKA3 durchgeführt. Qualitative PCR-Experimente der daraus resultierenden Plasmid-Pools ließen keinen Verlust einzelner cDNAs erkennen.

Das spezifische PCR-Signal eines cDNA-Klons nahm - wie theoretisch zu erwarten war - mit zunehmender Größe des Adenoviruspools ab. Das Signal verhielt sich proportional zum relativen Anteil des einzelnen Klons im Pool. Abbildung 39 zeigt die entsprechende Auftrennung der PCR-Produkte im Agarosegel.

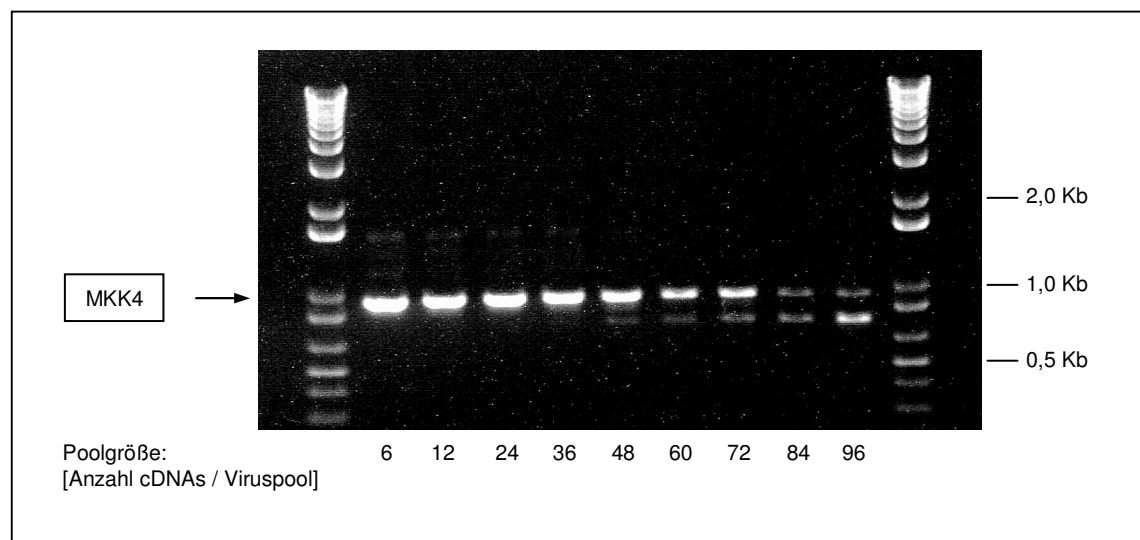


Abbildung 39: Spezifisches PCR-Signal eines cDNA-Klons in Viruspools ansteigender Größe (Auftrennung der DNA im 1prozentigen Agarosegel)

Pools rekombinanter Adenoviren mit 6 bis 96 verschiedenen cDNA-Klonen wurden hergestellt. Das PCR-Signal für die in allen Pools vorhandene cDNA der MAP-Kinase-Kinase-4 (MKK4) verhielt sich proportional zum relativen Anteil dieses Klons im Pool.

Anschließend wurden HEK Zellen mit einem Pool aus 96 rekombinanten Adenovirusplasmiden (pKA3) transfiziert. Nach Verpackung, Amplifikation und Aufreinigung der Adenoviren wurden die Stufen der Viruspoolherstellung mit PCR-Methoden kontrolliert. Die spezifischen PCR-Produkte für sechs cDNAs konnten

sowohl aus den Pools der Eingangs- und Expressionsvektoren als auch aus der gereinigten DNA des Viruspools amplifiziert werden. In der folgenden Abbildung 40 werden die entsprechenden Auftrennungen der Nukleinsäuren im Agarosegel dargestellt.

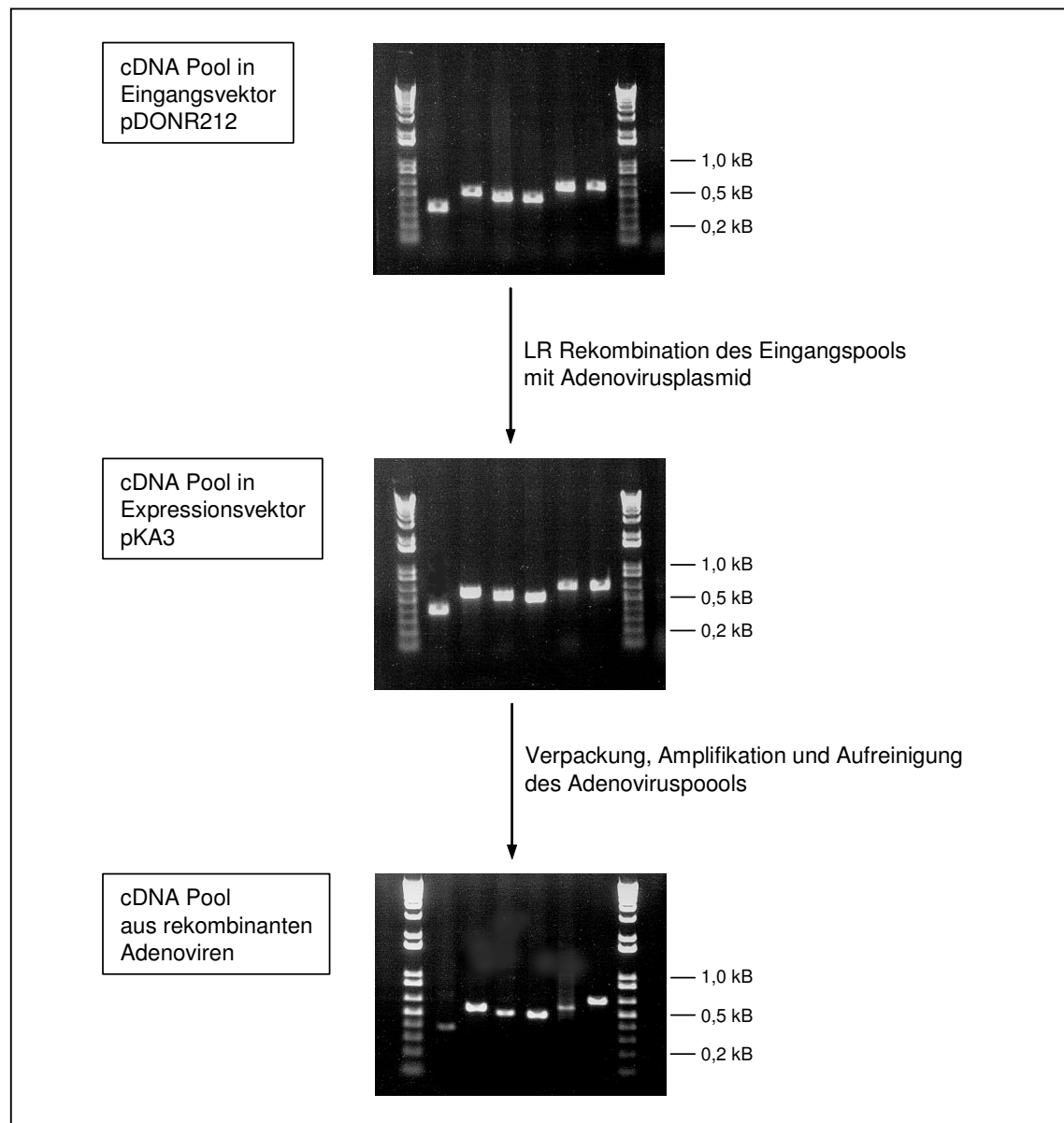


Abbildung 40: PCR-Kontrolle während der Herstellung eines rekombinanten Adenoviruspools (Auftrennung der DNA im 1prozentigen Agarosegel)

Eine cDNA-Bank aus 96 Klonen wurde in den Expressionsvektor pKA3 integriert. Anschließend wurden die entsprechenden Adenoviren in HEK Zellen amplifiziert und aufgereinigt. In allen Stufen der Herstellung des Viruspools konnten sechs repräsentative Klone der cDNA-Bank spezifisch durch PCR amplifiziert werden.

Die vorangegangenen Untersuchungen zeigten, dass bis zu 96 cDNA-Klone verlustfrei mit dem Expressionsvektor pKA3 rekombiniert und als Adenoviruspool amplifiziert werden konnten.

Die maximale Größe der Adenoviruspools war jedoch durch die funktionelle Auswertung in Kardiomyozyten limitiert und wurde in Zellkulturexperimenten mit Viruspools unterschiedlicher Größe bestimmt. Jeder Pool setzte sich aus definierten cDNAs zusammen und enthielt als Positivkontrolle die cDNA MDG136, deren Protein eine charakteristische morphologische Veränderung von Kardiomyozyten induziert. Die Transduktion primärer Kardiomyozyten mit den Pools zeigte, dass ein durch MDG136 hervorgerufener morphologischer Effekt in Poolgrößen bis zu 48 Klonen zu erkennen war. Die Analyse der Zellmorphologie wurde sowohl visuell als auch durch Bestimmung der Zellparameter im Laser Scanning Cytometer (LSC, CompuCyte, siehe „Ergebnisse 3.2.2.“) vorgenommen.

Basierend auf diesen Daten wurden Pools rekombinanter Adenoviren mit jeweils 12 Klonen der normalisierten cDNA-Bank hergestellt. Da der korrekte Leseraster der cDNAs unbekannt war, wurde jeder Klon mit den Vektoren pKA3 (a, b, c) rekombiniert, die eine Expression in drei möglichen Leserastern erlaubten. Mit einem Adenoviruspool war daher die Expression von 36 unterschiedlichen rekombinanten Proteinen möglich.

Wie im folgenden Fließschema der Abbildung 41 dargestellt, wurden für das Expressionsklonierungssystem insgesamt 288 rekombinante Adenoviruspools hergestellt. Nach ihrer Reinigung und Titerbestimmung (durchschnittlicher Titer $\approx 5 \times 10^9$ U / ml) wurden sie zur Transduktion der Kardiomyozyten eingesetzt.

Der Aufbau eines derartigen Zellkultursystems zur funktionellen Analyse wird im nächsten Abschnitt „Ergebnisse 3.“ dargestellt.

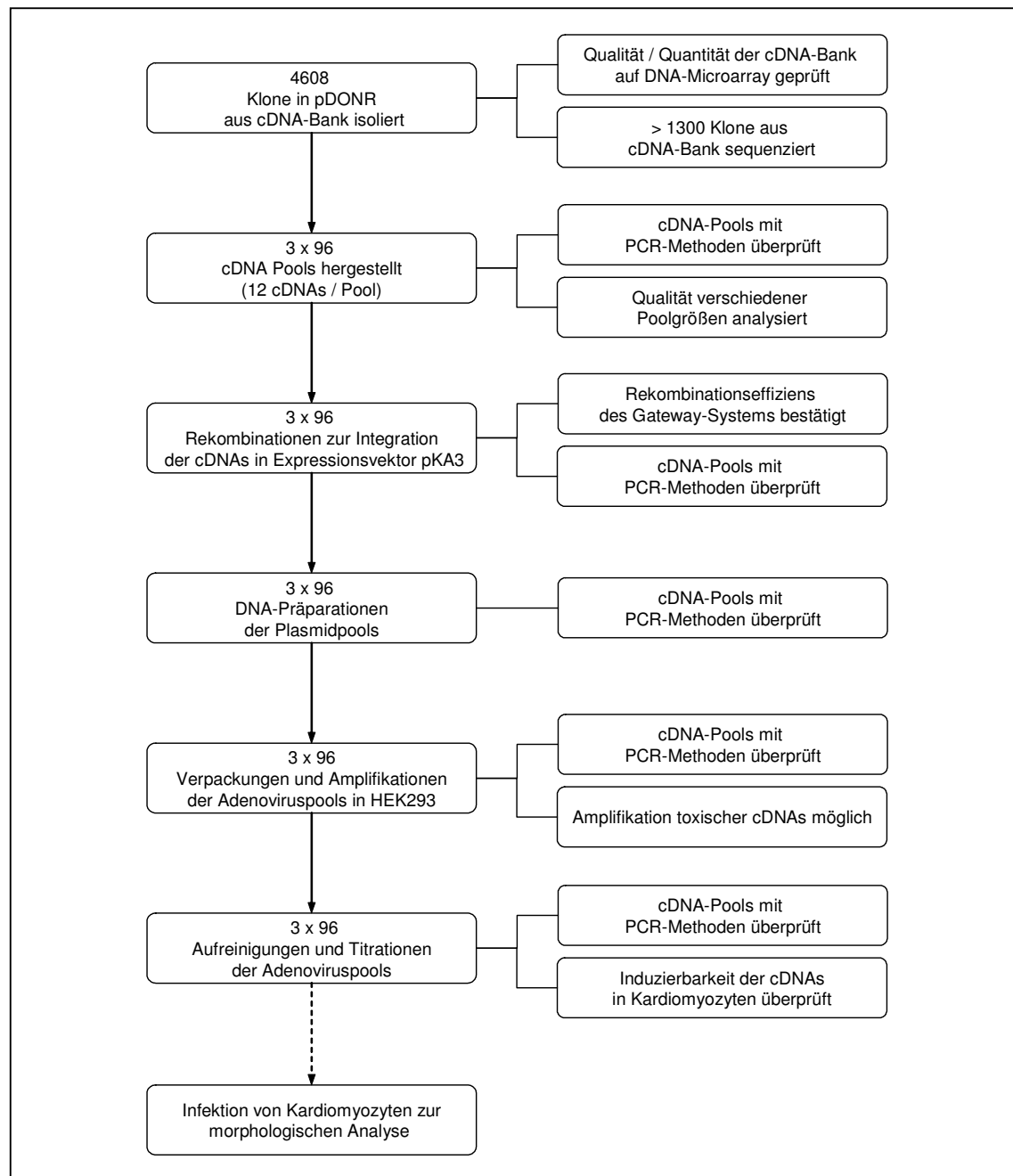
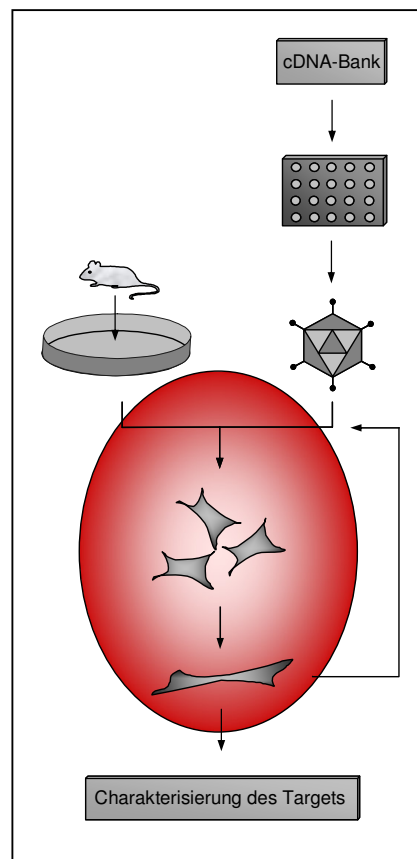


Abbildung 41: Fließschema zur Herstellung und Überprüfung von Pools rekombinanter Adenoviren

Jeweils 12 Klone der normalisierten cDNA-Bank wurden mit dem viralen Expressionsvektor pKA3 (in drei Leserastern) rekombiniert. Nach Transfektion von HEK-Zellen mit dem Plasmidpool wurden die entsprechenden rekombinanten Adenoviruspools verpackt, amplifiziert und aufgereinigt. Die einzelnen Stufen des Prozesses wurden durch Microarray- und PCR-Methoden überprüft. Insgesamt wurden auf diese Weise 288 Viruspools hergestellt.

3. Zelluläres System



3.1. Rekombinante Expression in Kardiomyozyten

Um die funktionelle Charakterisierung von cDNAs des Herzens in einem *in vitro* System hoher biologischer Aussagekraft durchzuführen, wurden die rekombinanten Proteine der cDNA-Bank in primären Kardiomyozyten aus neonatalen Ratten exprimiert.

3.1.1. Kulturbedingungen

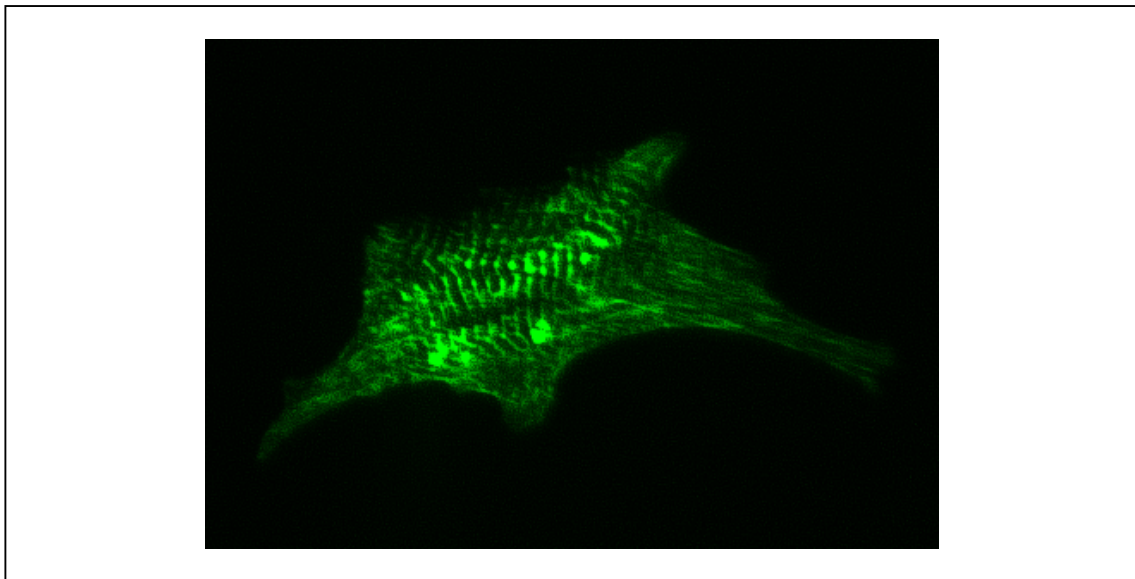
Die Parameter der *in vitro* Kultur wurden für die fluoreszenzbasierte Analyse der Morphologie nach Transduktion mit rekombinanten Adenoviren optimiert. Die Zellen wurden in Kammerobjektträgern mit geringer Autofluoreszenz kultiviert. Die Beschichtung der Objektträger mit Collagen I ermöglichte eine homogene Anheftung der Zellen und beeinträchtigte eventuelle morphologische Veränderungen der Zellstruktur nicht. Die Zellen wurden mit 100 μM des α -adrenergen Agonisten Phenylephrin supplementiert. Diese hypertrophe Stimulation verringerte die Heterogenität der Morphologie und erhöhte zugleich die Expressionsstärke der Markerproteine (CFP, YFP) sowie der rekombinanten cDNAs. Wie unter anderem im Abschnitt „Ergebnisse 3.1.3“ gezeigt wird, schränkte die generelle Stimulation die Induktion und Detektion morphologischer Veränderungen der Kardiomyozyten nicht ein.

3.1.2. Transduktion der Kardiomyozyten mit rekombinantischem Adenovirus AV pKA

Da die cDNAs im Vektorsystem pKA zwischen den Nukleinsäurebereichen zur homologen Rekombination (Gateway-System, Invitrogen, siehe „Methoden 2.1.6.“) integriert wurden, waren die exprimierten Proteine N-terminal von den entsprechenden acht Aminosäuren des Gateway-Systems flankiert. Die zusätzlichen Peptide hatten in Kardiomyozyten keinen Einfluss auf die Funktion und Lokalisation exemplarisch untersuchter Proteine:

Die von pKA 1, pKA2, pKA3 bzw. pKA4 kodierte bakterielle β -Galaktosidase war enzymatisch aktiv.

- Die Proteine der mittels homologer Rekombination in pKA integrierten Gene für YFP, CFP und RFP (Red Fluorescent Protein) konnten im Zytoplasma der Zelle detektiert werden.
- Die morphologischen Effekte der Proteine MDG5, MDG136 und der konstitutiv aktiven Mutante der Kinase MKK4 in Kardiomyozyten wurden nicht durch die flankierenden Peptide beeinflusst (siehe „Ergebnisse 3.1.3.2.“).
- Die Kontraktilität der Kardiomyozyten wurde nicht beeinflusst.
- Das durch den Vektor pKA2 exprimierte Protein α -Aktinin war nativ im Sarkomer der Kardiomyozyten lokalisiert (siehe Fluoreszenzaufnahme der Abbildung 42).



**Abbildung 42: Rekombinante Expression des sarkomeren α -Aktinins
(Zellanalyse im Fluoreszenzmikroskop)**

Das für α -Aktinin kodierende Gen wurde über homologe Rekombination in den Vektor pKA2 integriert und in Viruspartikel verpackt. Nach Transduktion mit dem Adenovirus AV pKA2 (α -Aktinin) wurde das rekombinante Protein in Kardiomyozyten exprimiert. Obwohl das rekombinante α -Aktinin N-terminal von den Peptiden der Rekombinationskassette (Gateway-System, Invitrogen) flankiert wurde, war seine native, charakteristische Lokalisation in den Sarkomeren der Zelle erkennbar. Die Zelle kontrahierte spontan.

3.1.3. Pathologische Relevanz der Morphologie von Kardiomyozyten

In den vorangegangenen Abschnitten wurde die rekombinante Expression exemplarischer cDNAs in Kardiomyozyten dargestellt. In diesem Zellkultursystem sollten auch die Proteine der normalisierten cDNA-Bank auf ihre pathologische Relevanz für die Herzinsuffizienz untersucht werden. Im Folgenden werden nun die bereits diskutierten pathomorphologischen Veränderungen der Kardiomyozyten im *in vitro* System induziert und in Korrelation zur humanen Erkrankung gesetzt.

Als prädiktiver Parameter der Herzinsuffizienz wird in der Klinik die Ausbildung einer pathologischen Hypertrophie des Ventrikels definiert. Die kausalen Veränderungen von Zellform und Anordnung der sarkomeren Einheiten *in vivo* manifestieren sich Literaturdaten zufolge auch im Zellkultursystem (King et al., 1998; Ng et al., 2001; Nicol et al., 2001). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher versucht, sowohl durch pathologische, extrazelluläre Stimulation als auch durch rekombinante Expression krankheitsassoziierter Proteine eine hypertrophe Morphologie primärer Kardiomyozyten im zellulären System der Expressionsklonierung zu induzieren.

3.1.3.1. Veränderung der Morphologie von Kardiomyozyten nach extrazellulärer, hypertropher Stimulation

Im Zellkultursystem konnte gezeigt werden, dass die α -adrenerge Stimulation der Zellen mittels Phenylephrin (PE, 100 μ M) zur Vergrößerung der Zellfläche mit paralleler Ausrichtung der kontraktilen Einheiten führte. Diese Morphologie korrelierte mit dem adaptiv, hypertrophen Phänotyp der Kardiomyozyten des humanen Herzens während der initialen Ausbildung der Erkrankung. Durch Stimulation des Zytokins Leukemia Inhibitory Factor (LIF, 1 ng/ml) wurde hingegen eine Elongation der Kardiomyozyten mit serieller Anordnung der Sarkomere induziert. Die Zellform spiegelte den Phänotyp der maladaptiven Hypertrophie wieder, die sich während der Progression der Erkrankung des dekompensierten

Herzens manifestiert, vgl. (King et al., 1998). Die Phänotypen der stimulierten Kardiomyozyten werden exemplarisch in Abbildung 43 dargestellt.

Die morphologischen Veränderungen auf Grund extrazellulärer Stimuli waren ein spezifisches Merkmal der Kardiomyozyten. Die Aktivierung dieser nicht herzzell-spezifischen Signaltransduktion, vermittelt über gp130-Rezeptoren (LIF) bzw. α -adrenerge Rezeptoren (PE), führte in bekannten Zelllinien hingegen zu keiner Änderung der Morphologie (siehe Abbildung 44), (Kunisada et al., 1998; Lockette et al., 1995; Molinoff, 1984).

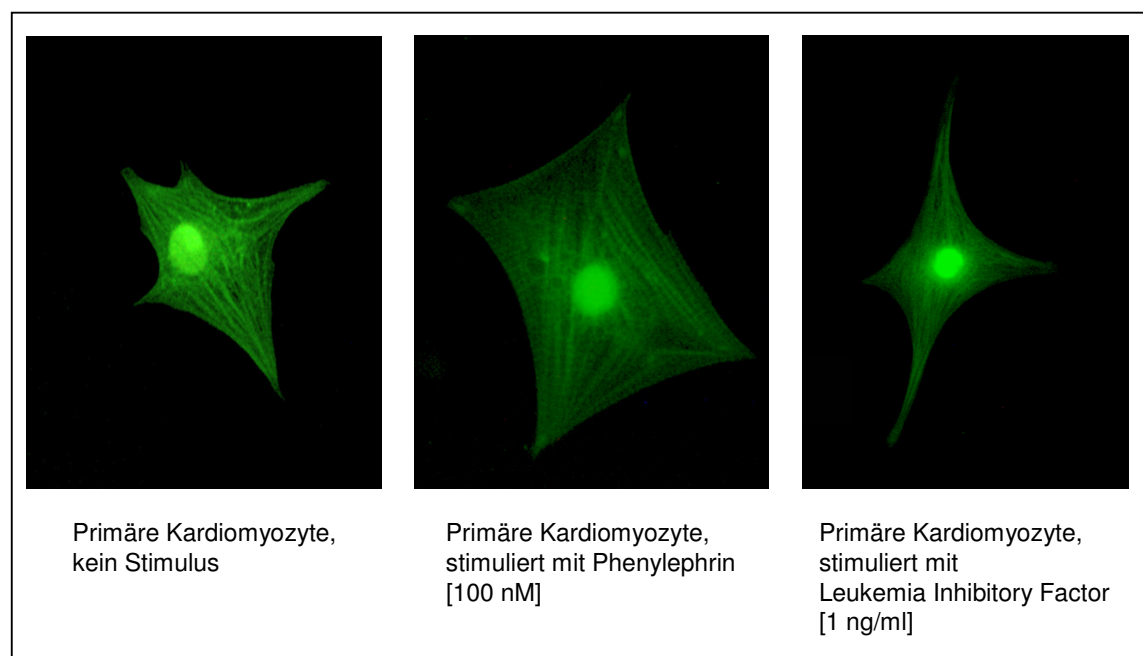
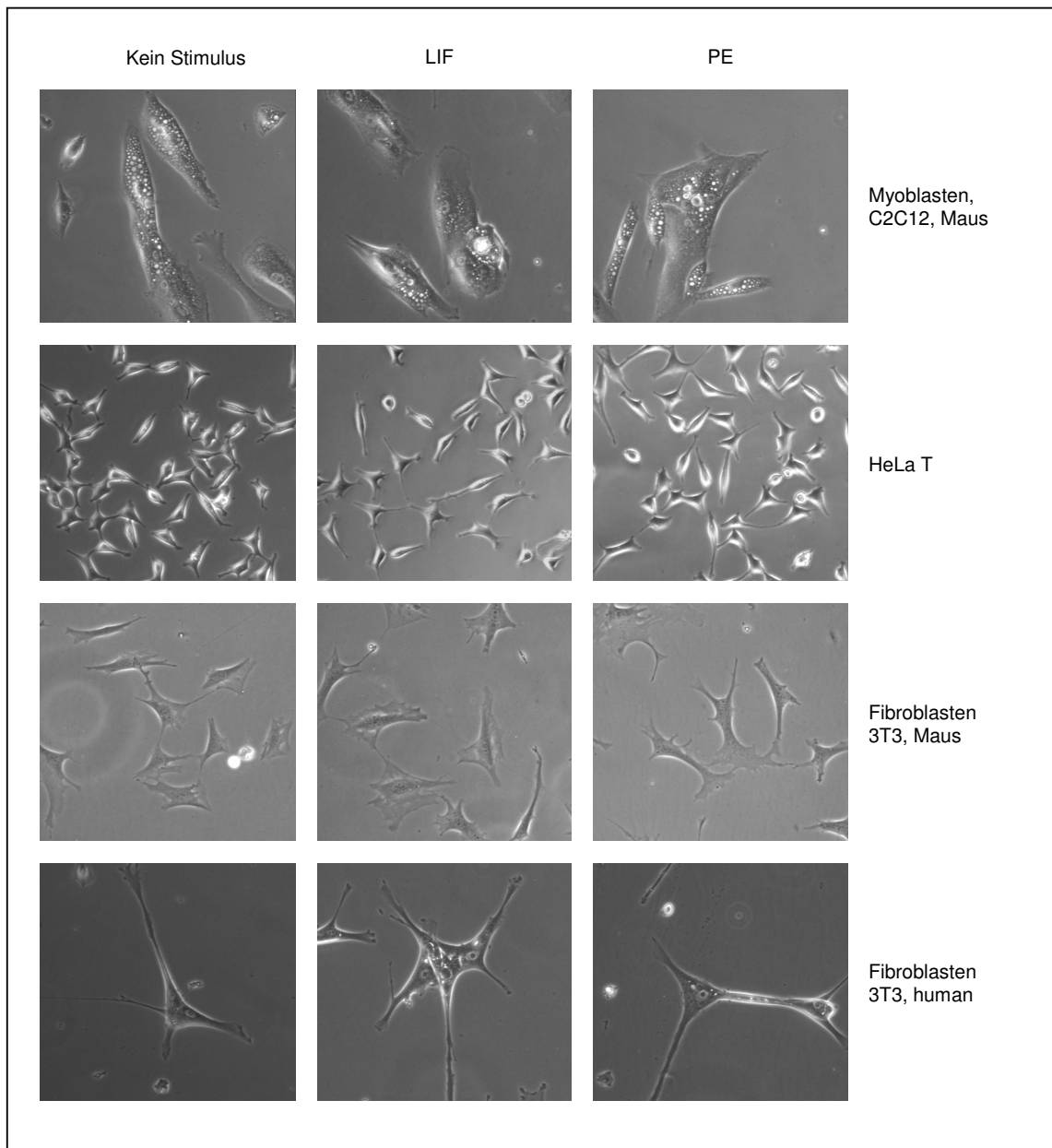


Abbildung 43: Primäre Kardiomyozyten ohne bzw. nach Stimulation mit Leukemia Inhibitory Factor (LIF) und Phenylephrin (PE) (Zellanalyse im Fluoreszenzmikroskop)

Primäre Kardiomyozyten aus neonatalen Ratten wurden ohne Stimulus bzw. in Anwesenheit der hypertrophen Agenzen Phenylephrin (PE) oder Leukemia Inhibitory Factor (LIF) kultiviert. Der α -adrenerge Agonist PE induzierte die Ausbildung einer adaptiv hypertrophen Zellform. LIF führte zu einer elongierten Morphologie, die dem Phänotyp der maladaptiven Hypertrophie entspricht. Die rekombinante Expression des Markerproteins YFP ermöglichte die Detektion im Fluoreszenzmikroskop.



**Abbildung 44: Zelllinien nach Stimulation mit Leukemia Inhibitory Factor (LIF) bzw. Phenylephrin (PE)
(Zellanalyse im Phasenkontrastmikroskop)**

Die Zelllinien C2C12 (murine Myoblasten), HeLaT (humanes Zervikalkarzinom) sowie 3T3 (murine bzw. humane Fibroblasten) wurden in Anwesenheit von Phenylephrin (PE, 100 μ M) bzw. Leukemia Inhibitory Factor (LIF, 1 ng/ml) kultiviert. Im Gegensatz zur Stimulation von Kardiomyozyten wurde hier keine Veränderung der Morphologie induziert.

3.1.3.2. Veränderung der Morphologie von Kardiomyozyten nach rekombinanter Expression regulatorischer Proteine

Die pathomorphologische Progression der Herzinsuffizienz wird unter anderem durch Modulation des Expressionsmuster krankheitsassoziierter Gene vermittelt. Um diese Situation *in vitro* nachzuahmen, wurden cDNAs in primären Kardiomyozyten rekombinant exprimiert, die im erkrankten Herz dereguliert und mit morphologischen Veränderungen der Kardiomyozyten assoziiert sind:

- Das verstärkt in der dilatativen Kardiomyopathie exprimierte Gen MDG136¹ induzierte eine Elongation der Zellen. Eine Verlängerung der Kultivierungsdauer oder verstärkte Überexpression führte zum Absterben der Zellen.
- Die konstitutiv-aktive Mutante der Map-Kinase MKK4 aus dem Hypertrophie assoziierten JNK-Signaltransduktionsweg verursachte die Ausbildung sternförmiger Zellausläufer.
- Das Gen MDG5² (Patent USSN 60 / 348,875) wurde verstärkt im insuffizienten humanen Herz exprimiert. Das korrespondierende Protein war für die Ausbildung von Zellausläufern verantwortlich und wies daher auf eine Assoziation mit der maladaptiven Hypertrophie hin.
- Das Gen MDG138³ (Patent WO 03025579) wurde ebenfalls verstärkt im erkrankten Herz exprimiert. Das Genprodukt führte *in vitro* zur Ausbildung eines adaptiv hypertrophen Phänotyps.

Die morphologische Analyse der transduzierten Kardiomyozyten bestätigte, dass auch durch rekombinante Expression bestimmter cDNAs im Zellkultursystem pathologische Veränderungen induziert werden konnten (siehe Abbildung 45).

¹ Unveröffentlichte Ergebnisse der Arbeitsgruppe Molekulare Kardiologie der MediGene AG

² Ergebnisse der Arbeitsgruppe Molekulare Kardiologie der MediGene AG

³ Ergebnisse der Arbeitsgruppe Molekulare Kardiologie der MediGene AG

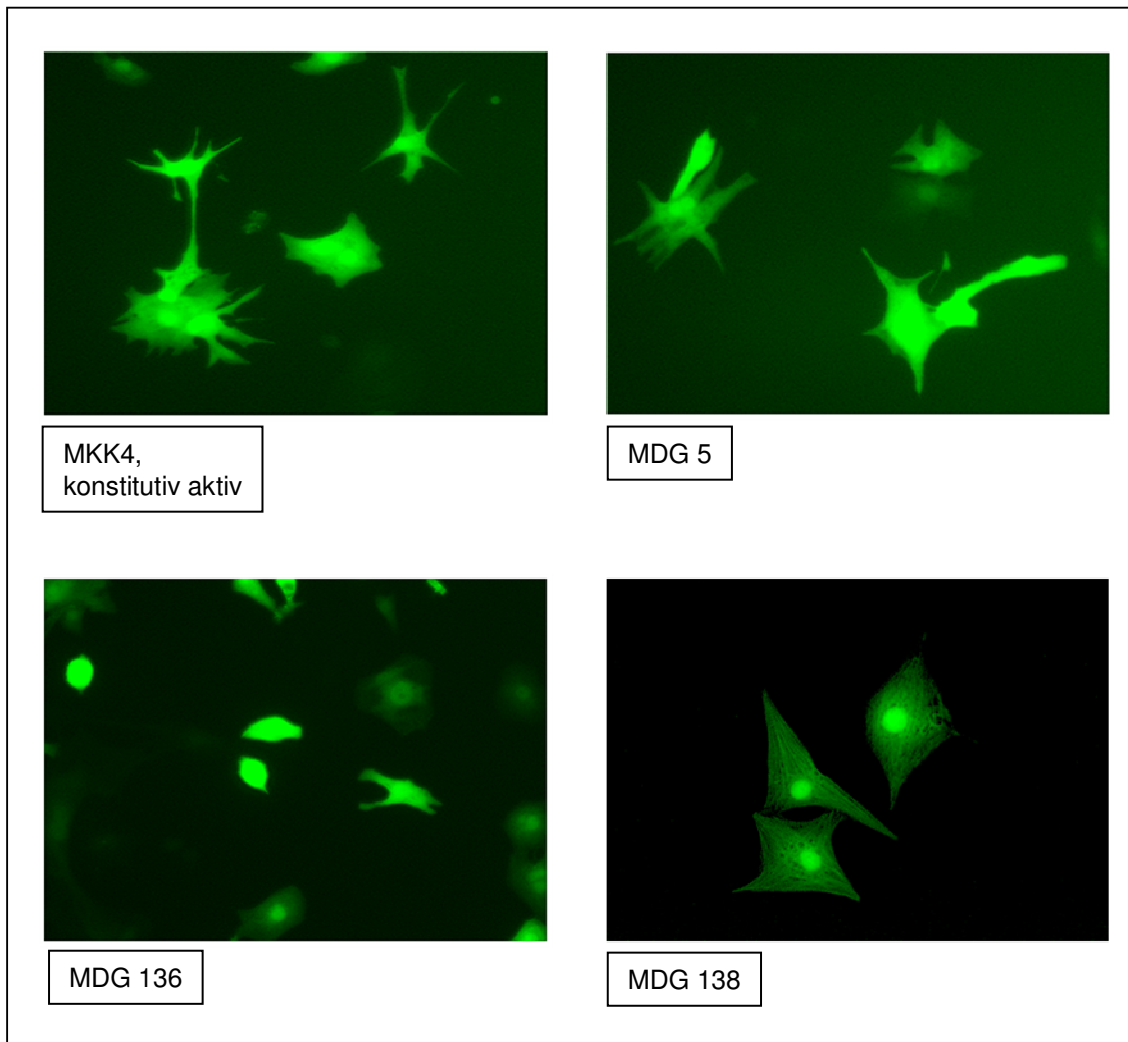


Abbildung 45: Transduktion primärer Kardiomyozyten zur Induktion pathologischer Morphologien (Zellanalyse im Fluoreszenzmikroskop)

Die cDNAs für die in der Herzinsuffizienz deregulierten Gene MDG5, MDG136, MDG138 sowie die konstitutiv-aktive MAP-Kinase MKK4 wurden in das virale Expressionssystem AV pKA3 integriert. Nach Induktion der rekombinanten Expression wurden pathologische Veränderungen der primären Kardiomyozyten beobachtet.

MDG5, MDG136: Mit der Herzinsuffizienz assoziierte Gene, die den Phänotyp der maladaptiven Hypertrophie induzieren

MDG138: Mit der Herzinsuffizienz assoziiertes Gen, das den Phänotyp der adaptiven Hypertrophie induziert

Konstitutiv aktiv MKK4: Konstitutiv aktive Map-Kinase des JNK-Signaltransduktionsweges, die den Phänotyp der maladaptiven Hypertrophie induziert

3.2. Analyse morphologischer Parameter

Um eine objektive Analyse der krankheitsassoziierten Morphologie der Kardiomyozyten zu ermöglichen, wurden definierte Parameter zur Charakterisierung der Zellform herangezogen. Es wurden zunächst theoretische Überlegungen zur Berechnung und analytischen Darstellung der Morphologie durchgeführt.

3.2.1. Abstraktion der Zellform

Die Form einer Zelle wurde geometrisch vereinfacht als Ellipse betrachtet. Diese Figur wird durch die Fläche A und den Umfang U definiert (siehe Abbildung 46, links).

$$A = \pi \cdot a \cdot b$$

$$U \approx \pi \left(\frac{3}{2} (a + b) - \sqrt{ab} \right)$$

a = Radius des Hauptkreises

b = Radius des Nebenkreises

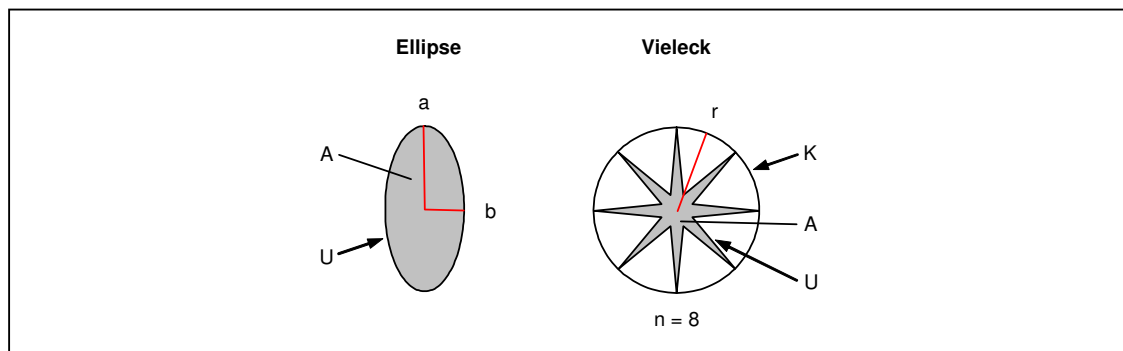


Abbildung 46: Idealisierung der Zellform

Die Morphologie der Kardiomyozyten wurde idealisiert als Ellipse oder Vieleck dargestellt. Die mathematischen Parameter dieser geometrischen Grundformen wurden zur Analyse der Zellform verwendet.

- a: Radius des Ellipsenhauptkreises
- b: Radius des Ellipsennebenkreises
- r: Radius des Umkreises um das Vieleck
- n: Anzahl der Strahlen des Vielecks
- A: Fläche
- U: Umfang
- K: Umkreis des Vielecks

Bei konstantem a und b verhalten sich A und U^2 direkt proportional zueinander. Das Verhältnis der beiden Parameter (A/U^2) wird als Formfaktor bezeichnet. Per Definition erhält der Formfaktor eines Kreises ($a = b$) den Wert 1. Verringert sich der Wert des Nebenkreises b im Verhältnis zum Hauptkreis a , so ergibt sich eine zunehmend elliptische Figur, das Verhältnis (A/U^2) wird kleiner, der Formfaktor nimmt Werte < 1 an. Trägt man die Parameter A und U^2 von Ellipsen unterschiedlicher Form und Größe im Diagramm auf, so liegen alle identischen Zellformen mit demselben Formfaktor auf einer Geraden durch den Ursprung. Die Ellipsen auf einer Geraden unterscheiden sich somit nur in ihrer Größe. Die nächste Abbildung 47 zeigt die Auftragung der Parameter Fläche und Umfang² von Ellipsen unterschiedlicher Formfaktoren.

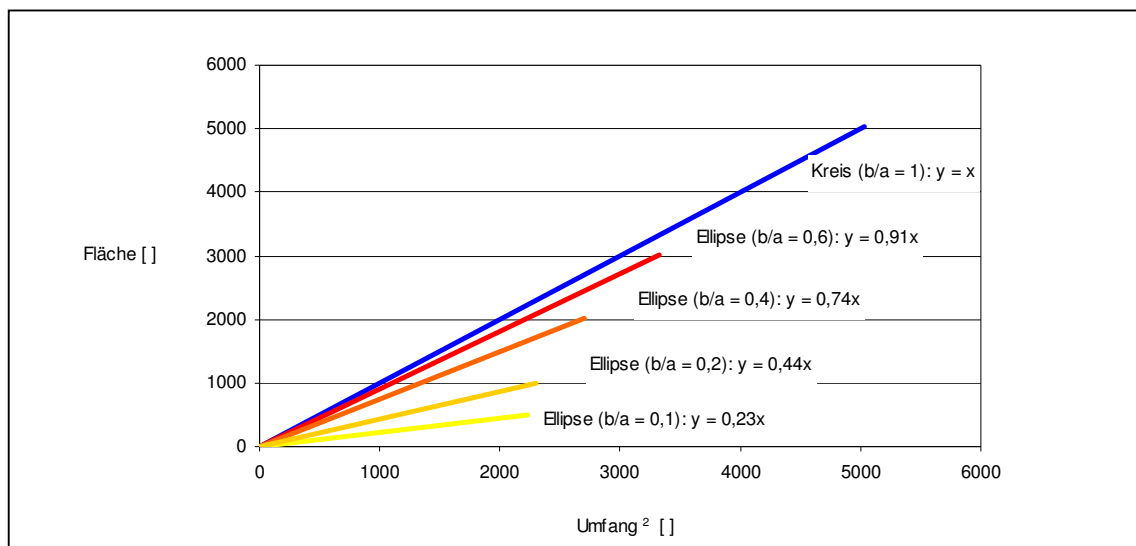


Abbildung 47: Darstellung theoretischer, elliptischer Zellformen

Die Morphologie einer Zelle wurde theoretisch als Ellipse betrachtet. Alle Ellipsen gleicher Form liegen auf einer Geraden, deren Verhältnis von Fläche / Umfang² (\equiv Formfaktor) konstant ist. Mit zunehmender Elliptizität nimmt die Geradensteigung ab.

- a: Radius des Ellipsenhauptkreises
- b: Radius des Ellipsennebenkreises

Neben der elongierten, elliptischen Zellform wurden *in vitro* auch Kardiomyozyten mit sternförmigen Zellausläufern beobachtet (vgl. Abb. 45). Auch diese mit der maladaptiven Hypertrophie assoziierte Zellform wurde theoretisch berechnet:

Als ideale Zellform wurde ein Vieleck definiert. Die Anzahl der Ecken n ist mit der Anzahl der strahlenförmigen Zellausläufer identisch. Die Entfernung vom geometrischen Mittelpunkt bis zur Ecke des Vielecks entspricht dem Radius r des Umkreises K . Bildet man den Grenzwert der Fläche des Vielecks $\lim_{A \rightarrow 0}$, so ergibt sich für den Umfang des Vielecks U (siehe auch Abbildung 46, rechts):

$$\lim_{A \rightarrow 0} U = 2 \cdot r \cdot n$$

Dies bedeutet, dass sich bei sternförmigen Zellformen mit geringer Zellfläche der Umfang direkt proportional zur Anzahl der Strahlen verhält. Trägt man die Parameter dieser Formen in das obige Diagramm ein, so befinden sich die sternförmigen Zellformen auf der x-Achse. Mit wachsenden x -Werten (Umfang²) nimmt bei konstanter Zellfläche und konstantem Umkreisradius r die Anzahl der Strahlen der Zellform zu. Die Ergebnisse werden in der folgenden Abbildung 48 verdeutlicht.

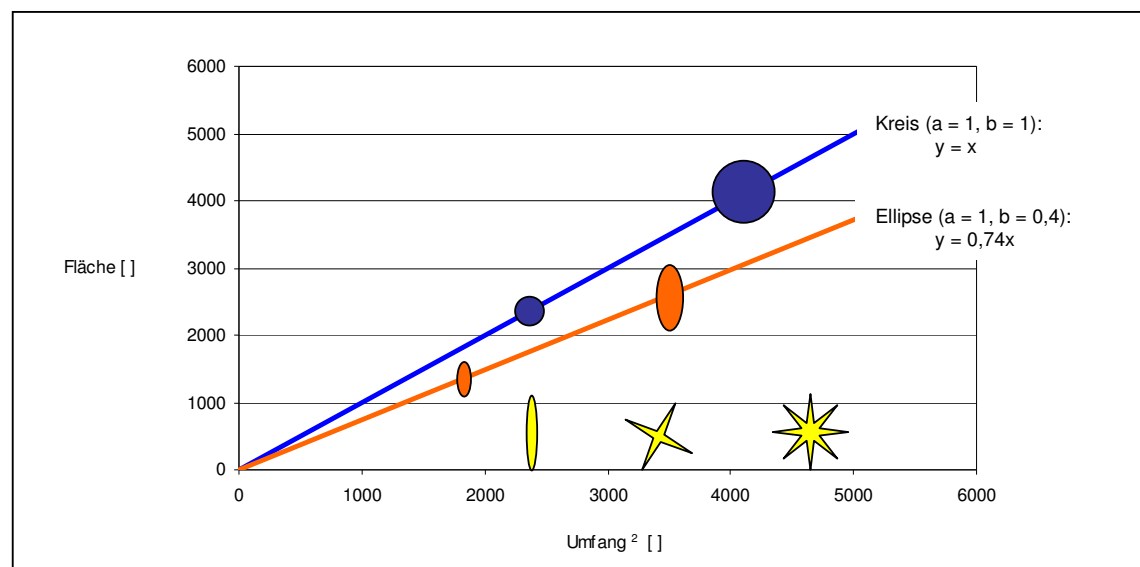


Abbildung 48: Darstellung theoretischer elliptischer und sternförmiger Zellformen

Die Morphologie der Zelle wurde vereinfacht als Ellipse oder sternförmiges Vieleck abstrahiert. Alle Ellipsen gleicher Zellform liegen auf einer Geraden durch den Koordinatenursprung. Die Zellfläche nimmt proportional zum Umfang zu. Sternförmige Vielecke mit konstanter Fläche und konstantem Umkreis befinden sich auf einer Parallelen zur x-Achse. Die Anzahl der Strahlen verhält sich proportional zum Umfang.

- a: Radius des Ellipsenhauptkreises
- b: Radius des Ellipsennebenkreises

Durch Abstraktion der *in vitro* Morphologie von Kardiomyozyten kann somit die theoretische Zellform durch die beiden Parameter Umfang und Fläche objektiv analysiert werden. Bei der Auftragung der Parameter im Diagramm (x-Achse = Zellumfang²; y-Achse = Zellfläche) nimmt die Elongation und Anzahl der Zellausläufer in x-Richtung zu. Große Umfangswerte bei gleichzeitig kleiner Zellfläche entsprechen daher der Morphologie der maladaptiven Hypertrophie. Bewegt man sich im Diagramm in y-Richtung, so wird die Zellform abgerundeter. Eine große Zellfläche mit kleinem Zellumfang spiegelt daher den adaptiv hypertrophen Zelltyp wieder. Im folgenden Abschnitt werden nun diese theoretischen Ableitungen als Basis zur praktischen Analyse der Zellmorphologie primärer Kardiomyozyten herangezogen

3.2.2. Zellanalyse mittels Laser Scanning Cytometer

Im Expressionsklonierungssystem sollten Kardiomyozytenpopulationen mit den in Abschnitt „Ergebnisse 2.2“ beschriebenen 288 DNA-Pools transduziert und morphologisch analysiert werden. Eine objektive Analyse der morphologischen Parameter im erforderlichen hohen Durchsatz war jedoch durch eine visuelle Inspektion des Experimentators nicht erreichbar. Zur reproduzierbaren, statistisch relevanten Detektion der Morphologie wurde daher ein automatisiertes Screeningsystem auf der Basis des Laser Scanning Cytometers (LSC, CompuCyte) entwickelt:

Zunächst wurden mit dem rekombinanten Adenovirus AV pKA transduzierte und das Markerprotein YFP exprimierende Kardiomyozyten auf dem Objektträger fixiert. Dieser wurde zur Analyse auf dem motorgesteuerten Kreuztisch des LSCs befestigt und in Intervallen von 5 µm vom LSC rasterförmig gescannt. Dabei wurde die Fluoreszenz des YFP-Markerproteins mittels Argonlaser angeregt und das von den Kardiomyozyten emittierte Signal schrittweise pro 0,25 µm² Zellfläche detektiert. Auf diese Weise wurden Position, Ausdehnung und Fluoreszenzstärke aller auf dem Objektträger gescannten Zellen bestimmt. Auf Grund der automatisierten Arbeitsweise konnten mit dieser Methode ca. 1.000 Zellen pro Stunde vermessen werden. Die aus den Rohdaten berechneten Parameter Zellfläche und Zelldurchmesser² wurden anschließend im Streudiagramm dargestellt. Abbildung 49 zeigt das beschriebene LSC-Screening schematisch.

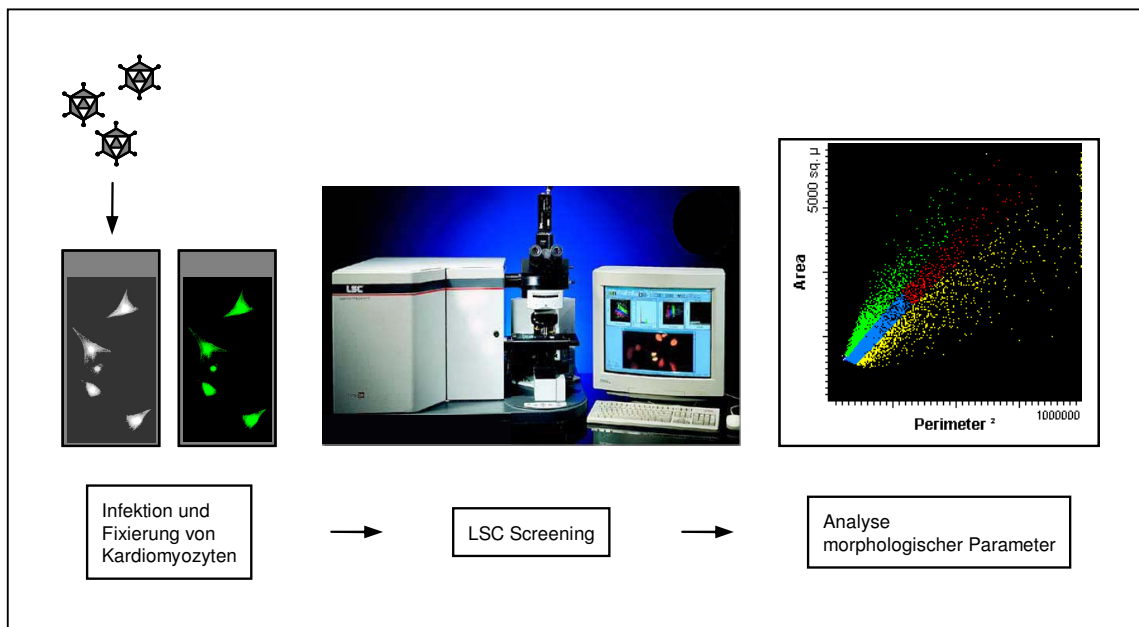


Abbildung 49: Analyse der Morphologie von Kardiomyozyten mittels Laser Scanning Cytometer (LSC)

Nach AV-Infektion und rekombinanter YFP-Expression wurden Kardiomyozyten auf dem Objektträger fixiert. Im LSC wurde durch Detektion des Fluoreszenzsignals Position, Ausdehnung und Fluoreszenzintensität der Kardiomyozyten ermittelt. Zur Analyse der Morphologie wurden die Parameter Zellfläche (Area) und Zellumfang (Perimeter) anschließend im Streudiagramm dargestellt.

Um die Genauigkeit der LSC-Analyse zu erhöhen, wurden die Zellen bezüglich ihres Fluoreszenzsignals selektiert. Nach Akquisition der Rohdaten eines LSC-Screens wurde zunächst die Homogenität des Fluoreszenzsignals der Zellen analysiert. Zellen mit zu geringer Fluoreszenz in den Randbereichen wurden aussortiert, da eventuelle periphere Zellausläufer nicht vollständig detektiert wurden (Abbildung 50, linkes Diagramm). Zusätzlich wurden zur weiteren Auswertung nur Zellen mit einem deutlich detektierbaren Fluoreszenzsignal herangezogen (Abbildung 50, mittleres Diagramm). Das hohe YFP-Signal deutete auf eine effiziente, rekombinante Expression in diesen Zellen hin. Außerdem war eine möglichst hohe Fluoreszenz notwendig, um das Verhältnis des Zellensignals zur Hintergrundfluoreszenz zu maximieren. Durch die Zellselektion wurde die Bandbreite der Zellformen und -größen nicht verringert (Abbildung 50, rechtes Diagramm). Die Anzahl der Zellen, deren Fluoreszenzsignal die Analyse verfälschen könnte, wurde jedoch signifikant reduziert.

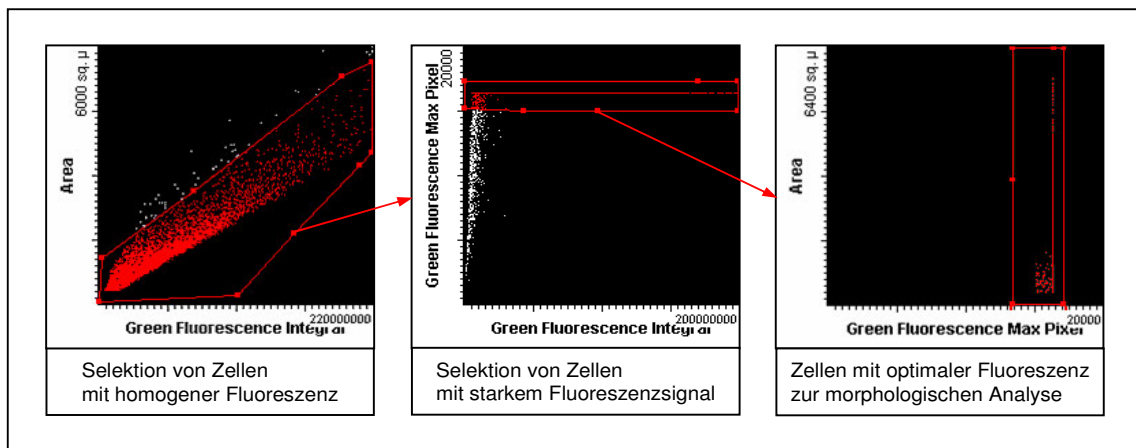


Abbildung 50: Optimierung der Fluoreszenzanalyse von Kardiomyozyten

Alle Zellen eines LSC-Screenings wurden bezüglich ihrer Fluoreszenzsignale selektiert. Zellen mit inhomogener oder zu geringer Fluoreszenz wurden nicht zur weiteren Analyse der Morphologie herangezogen.

Area:	Zellfläche
Green Fluorescence Integral:	Integral der YFP-Fluoreszenz pro Zelle
Green Fluorescence Max Pixel:	Maximale YFP-Fluoreszenz pro Zelle

Die Darstellung der Zellparameter Fläche und Durchmesser im Streudiagramm ermöglichte eine erste Einschätzung der Morphologieverteilung der gescannten Kardiomyozyten. Unter Berücksichtigung der in Abschnitt „Ergebnisse 3.2.1“ beschriebenen Definitionen für geometrische Zellformen wurde die Diagrammfläche in einzelne Bereiche untergliedert, die mit charakteristischen Morphologien korrelierten. In der Abbildung 51 werden die den Koordinaten des Streudiagramms entsprechenden Morphologien dargestellt.

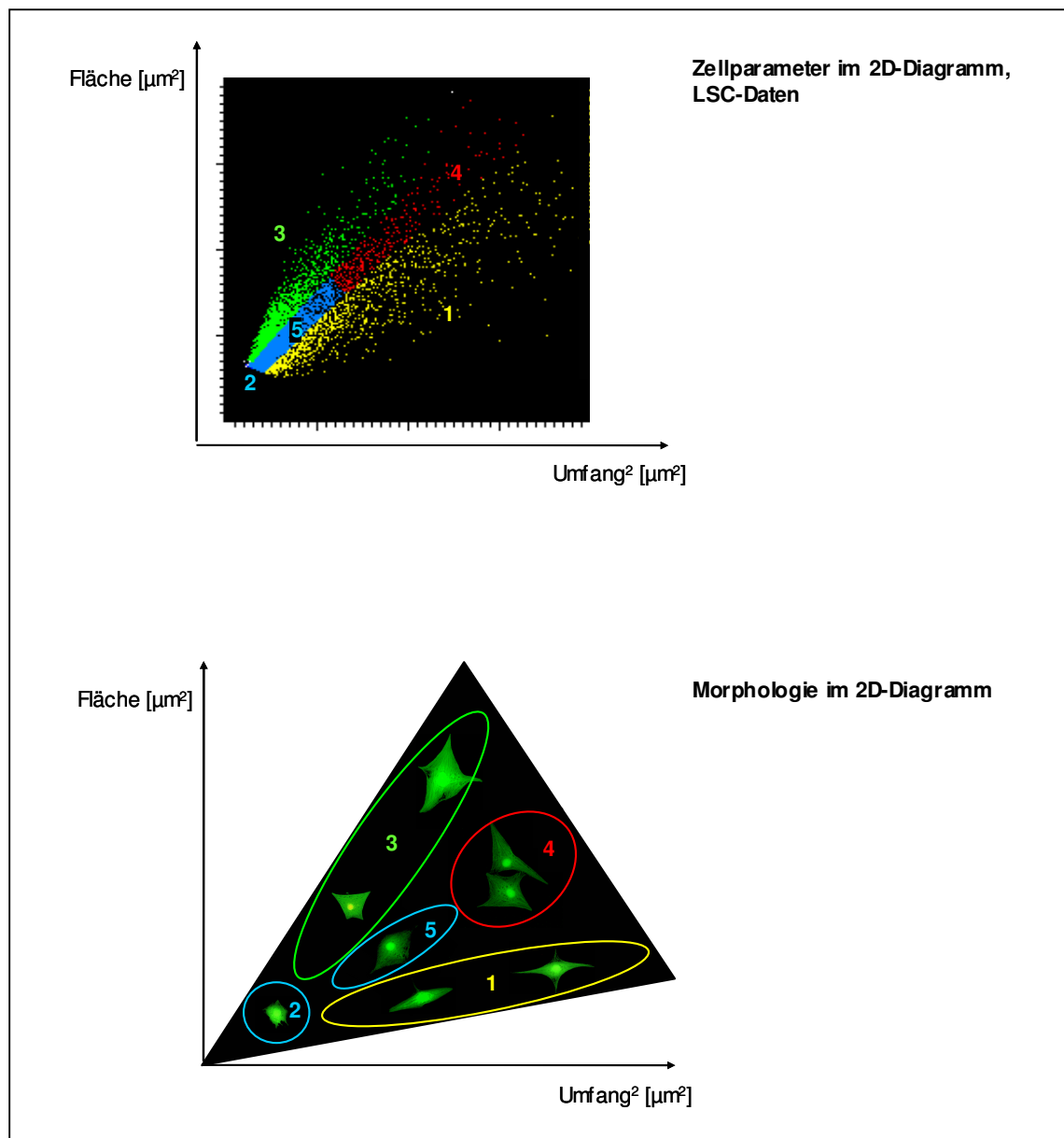


Abbildung 51: Korrelation zwischen Koordinaten im Streudiagramm und Morphologie der Kardiomyozyten

Durch LSC-Analyse wurden die Parameter Umfang und Fläche der Kardiomyozyten bestimmt und im 2D-Diagramm dargestellt. Entsprechend der theoretischen Kalkulation der Zellform wurden distinkte Koordinaten des Diagramms charakteristischen *in vitro* Morphologien zugeordnet:

Diagrammbereich 1:	elongierte Morphologie maladativ hypertropher Kardiomyozyten
Diagrammbereich 2:	sphäroidische Morphologie absterbender Kardiomyozyten
Diagrammbereich 3:	flächige Morphologie adaptiv hypertropher Kardiomyozyten
Diagrammbereich 4:	physiologische Morphologie von Kardiomyozyten mit großer Zellfläche
Diagrammbereich 5:	physiologische Morphologie von Kardiomyozyten mit kleiner Zellfläche

Die theoretisch bestimmten Morphologien konnten durch wiederholtes, selektives Scannen von Kardiomyozyten aus ausgewählten Bereichen des Streudiagramms überprüft werden. Die hierbei vom LSC ermittelten und in Abbildung 52 dargestellten Bilder der Einzelzellen bestätigten die Korrelation zwischen Diagrammkoordinaten und Zellform in der Praxis.

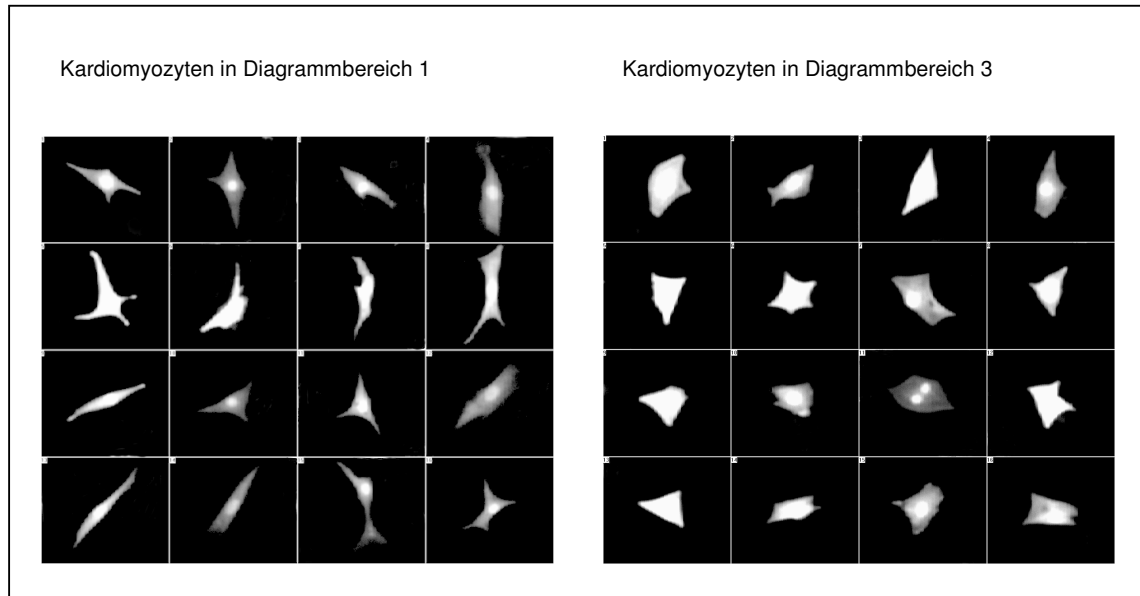


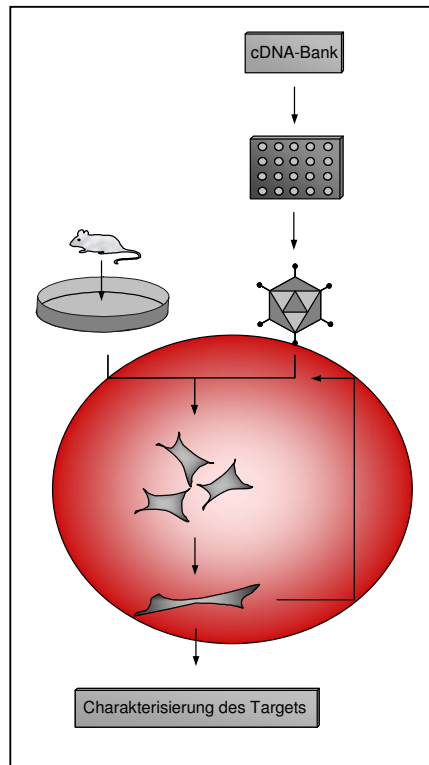
Abbildung 52: LSC-Sekundärscreening von Kardiomyozyten aus selektiven Bereichen des Streudiagramms

Kardiomyozyten wurden im LSC analysiert. Die Diagrammbereiche elongierter Zellform (Bereich 1 in Abb. 51) und flächiger Zellform (Bereich 3 in Abb. 51) wurden erneut mit dem LSC gescannt. Die hierbei ermittelten realen Morphologien entsprachen der theoretisch berechneten Zellform.

Die Analyse von Kardiomyozyten mittels Laser Scanning Cytometer erwies sich somit als effiziente Methode zur objektiven Bestimmung der Morphologie anhand der zwei geometrischen Parameter Zellfläche und -umfang. Das hier erstmals entwickelte Verfahren ermöglichte es, eine große Anzahl von Zellen in kurzer Zeit mit hoher Reproduzierbarkeit zu analysieren. Durch die Möglichkeit der Visualisierung einzelner Zellen im Sekundärscreening konnten die Ergebnisse jederzeit überprüft werden.

Im folgenden Kapitel „Ergebnisse 4.“ wird nun die Anwendung des Screeningsystems zur funktionellen Analyse von cDNA-Pools in Kardiomyozyten beschrieben.

4. Expressionsklonierung in Kardiomyozyten



4.1. Statistische Auswertung morphologischer Parameter

Wie im Abschnitt „Ergebnisse 3.1.3“ beschrieben, konnte durch extrazelluläre Stimulation oder rekombinante Überexpression eine pathologische Morphologie primärer Kardiomyozyten erzielt werden. Zur objektiven Überprüfung dieser visuell ermittelten Aussage und der statistischen Validierung des Screeningsystems wurden die entsprechenden Zellansätze im LSC gescannt. Um eine hohe Signifikanz der Ergebnisse zu erzielen, wurden pro Scan mehr als 1.000 Kardiomyozyten vermessen. Um Differenzen zwischen den Verteilungen verschiedener Zellpopulationen zu detektieren, wurden die Daten anschließend statistisch ausgewertet. Die Streuung der Datenpunkte für Fläche und Umfang entsprach jedoch keiner Normalverteilung. Der Median der unsymmetrischen Verteilungen wies einen deutlich kleineren Wert als der Populationsmittelwert auf. Die diskontinuierlichen Verteilungen wurden daher mittels Mann-Whitney-Test verglichen. Waren statistisch signifikante Unterschiede zweier Verteilungen festgestellt worden, so wurden die Zellen entsprechend ihrer Parameter Fläche und Umfang im Streudiagramm in charakteristische Gruppen gegliedert. Diese Eingliederung diente der detaillierten Analyse der Morphologie einer Zellpopulation. Die folgende Abbildung 53 verdeutlicht das Verfahren der morphologischen Auswertung.

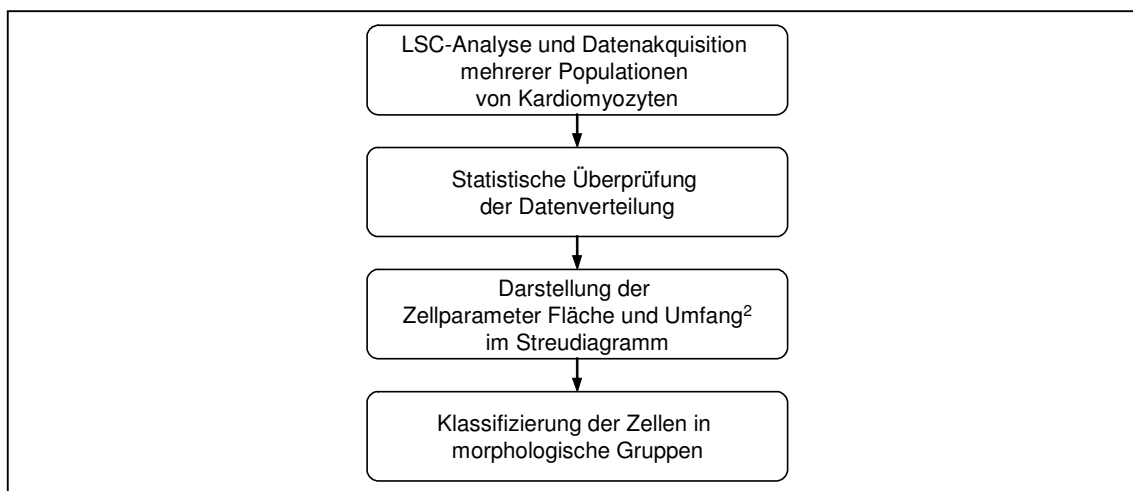


Abbildung 53: Auswertung der morphologischen Parameter von Kardiomyozyten

Primäre Kardiomyozyten wurden mittels LSC gescannt. Die Zellen wurden anhand der Parameter Fläche und Umfang in morphologische Gruppen gegliedert und auf signifikante Unterschiede zu anderen Zellpopulationen untersucht.

4.1.1. Induktion pathologischer Morphologien durch extrazelluläre Stimulation

Zunächst wurden Kardiomyozyten nach hypertropher LIF- bzw. PE-Stimulation im LSC gescannt (siehe auch Abschnitt „Ergebnisse 3.1.3.1“) und die Zellpopulationen anschließend statistisch analysiert.

Hierbei wurden die Datenverteilungen im Mann-Whitney-Test nach ihren Rangsummen geordnet und in vier Quartilen Q1 – Q4 mit der gleichen Anzahl von Werten unterteilt. 50 % der Werte liegen innerhalb des Interquartilenabstands $d_Q = x_{Q3} - x_{Q1}$. Der Median \tilde{x} entspricht dem Zentralwert der Verteilung und ist mit x_{Q2} identisch. Die Verteilungen der Zellparameter Fläche und Umfang² wurden graphisch als Box-Plot mit den Daten für Median, Q1 und Q3 dargestellt. Statistische Unterschiede der analysierten Verteilungen wurden bei einer Fehlerwahrscheinlichkeit $p \leq 10^{-3}$ als signifikant angesehen.

Die Analyse zeigte, dass der erhöhte Zellumfang der elongierten Kardiomyozyten nach LIF-Stimulation signifikant vom entsprechenden Wert PE-stimulierter Zellen abwich. Die physiologischen, unstimulierten Zellen waren durch ihre kleinere Zellform gekennzeichnet. Sie unterschieden sich von den stimulierten Kardiomyozyten signifikant durch reduzierte Zellfläche und Zellumfang. Die statistische Auswertung der Zellpopulationen wird in der folgenden Abbildung 54 gezeigt.

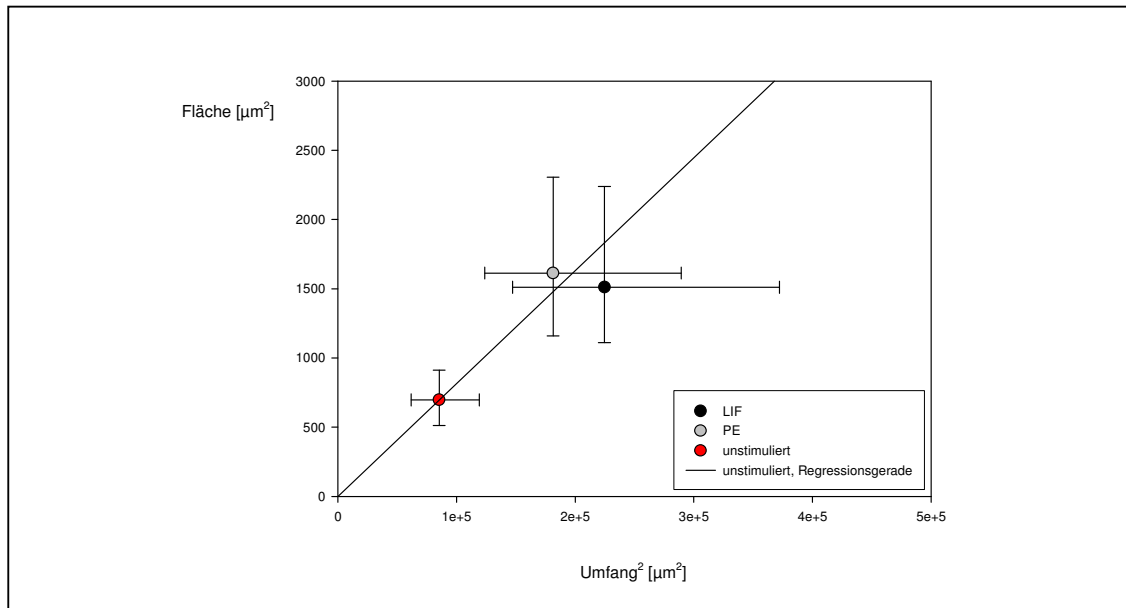


Abbildung 54: Charakteristische Morphologien von Kardiomyozyten nach extrazellulärer Stimulation (Statistische Auswertung der Verteilungen für Zellfläche und Zellumfang)

Primäre Kardiomyozyten wurden mit Phenylephrin (PE) bzw. Leukemia Inhibitory Factor (LIF) stimuliert. Der Zellumfang der elongierten, maladaptiv hypertrophen Kardiomyozyten nach LIF-Stimulation war signifikant größer als der Umfang der flächigen, adaptiv hypertrophen Zellen nach PE-Stimulation. Kleinere, unstimulierte Zellen wichen signifikant in Fläche und Umfang von den stimulierten Zellpopulationen ab.

Die Darstellung des Mann-Whitney-Tests im 2D-Diagramm ermöglichte somit bereits eine erste Beurteilung der Morphologie einer Zellpopulation auf Grund ihrer statistischen Kenndaten. Zur umfassenden morphologischen Analyse wurden jedoch die Einzeldaten für Umfang und Fläche jeder Zelle einer Population herangezogen.

Auf Grund ihres Datenpunktes für Fläche und Durchmesser im Streudiagramm (siehe Abbildung 51) wurde jede Zelle eines Scans einer von fünf morphologisch charakteristischen Gruppen zugeordnet. Diese Auswertung wurde im Folgenden als Säulendiagramm dargestellt. Die Analyse der LSC-Daten bestätigte die zuvor visuell ermittelten pathologischen Morphologien. Im Vergleich zur unstimulierten Zellpopulation wurde durch adrenerge Stimulation mit PE der relative Anteil adaptiv hypertropher Zellen mit flächiger Morphologie von 22 % auf 40 % erhöht. Durch Stimulation mit dem Zytokin LIF wurde hingegen die Morphologie der maladaptiven Hypertrophie induziert. Der Anteil elongierter Zellen erhöhte sich von 22 % auf 52 %. Verglichen mit unstimulierten Kardiomyozyten wurde sowohl durch

PE- als auch LIF-Stimulation eine stark vergrößerte Zellfläche hervorgerufen. Der Anteil großflächiger Zellen mit physiologischer Morphologie erhöhte sich von 5 % auf durchschnittlich 24 %. Gleichzeitig nahm der Anteil kleiner und sphäroidischer Zellen mit pathologischer Morphologie signifikant ab. Diese morphologischen Daten werden im Säulendiagramm der Abbildung 55 dargestellt.

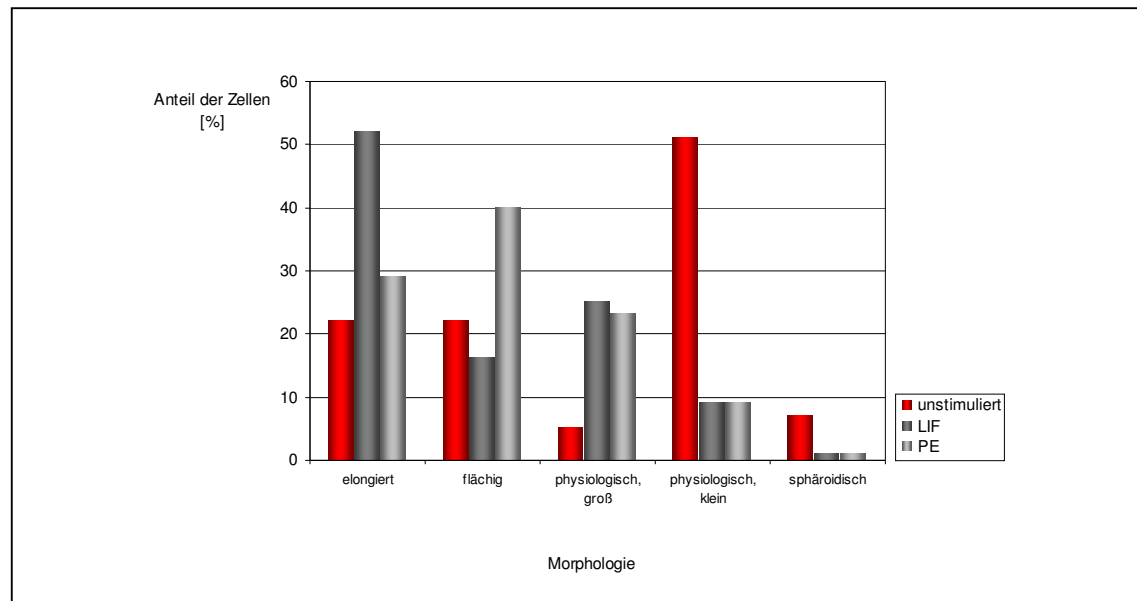


Abbildung 55: Charakteristische Morphologien von Kardiomyozyten nach extrazellulärer Stimulation (Auswertung charakteristischer Regionen des LSC-Streudiagramms)

Primäre Kardiomyozyten wurden mit Phenylephrin (PE) bzw. „Leukemia Inhibitory Factor“ (LIF) stimuliert. Die Auswertung im LSC zeigte, dass sich nach PE Supplementierung der Anteil adaptiv hypertropher Zellen mit flächiger Morphologie von 22 % auf 40 % annähernd verdoppelte. Durch Stimulation mit LIF erhöhte sich der Anteil maladapтив hypertropher Zellen mit elongierter Morphologie von 22 % auf 52 %.

4.1.2. Induktion pathologischer Morphologien durch rekombinante Expression

Wie im Abschnitt „Ergebnisse 3.1.3.2“ beschrieben, wurden auch durch rekombinante Expression spezifischer Proteine pathologische Morphologien induziert. Zur Validierung des Screeningverfahrens wurden daher Kardiomyozyten analysiert, in denen diese krankheitsassoziierten Proteine heterolog exprimiert wurden.

Im LSC wurden drei Zellpopulationen analysiert, in denen die Proteine MDG136, MDG138 bzw. die konstitutiv aktive Mutante der Kinase MKK4 überexprimiert worden waren. Der statistische Vergleich der drei Zellpopulationen mit der Kontrollgruppe bestätigte signifikante Unterschiede bezüglich Zellfläche und Zellumfang. Dies wird auch in Abbildung 56 gezeigt.

Das Protein MDG136 und die konstitutiv aktive Kinase MKK4 führten zu einer proportionalen Reduktion von Zellfläche und -umfang. Der Mann-Whitney-Test verdeutlichte somit die signifikante Abnahme der Zellgröße. Eine detailliertere morphologische Analyse wurde durch nachfolgende Auswertung des Streudiagramms ermöglicht.

Das Protein MDG138 induzierte hingegen eine Zunahme der mittleren Zellfläche bei gleichzeitiger Verringerung des Zellumfangs. Die statistische Auswertung wies also bereits auf eine adaptiv hypertrophe Morphologie der Zellpopulation hin.

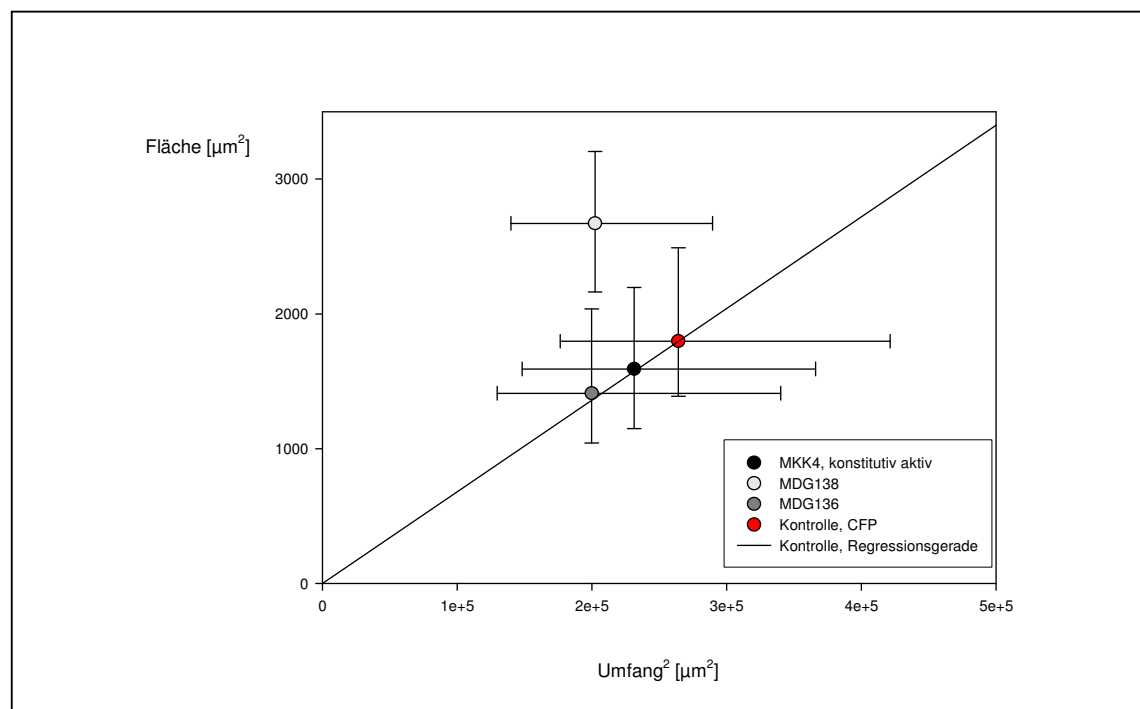


Abbildung 56: Charakteristische Morphologien von Kardiomyozyten nach rekombinanter Expression (Statistische Auswertung der Verteilungen für Zellfläche und Zellumfang)

In primären Kardiomyozyten wurden Proteine überexprimiert, die pathologische Morphologien induzierten. Der Mann-Whitney-Test bewies eine signifikante Reduktion der Parameter Zellfläche und Zellumfang nach Expression von MDG136 bzw. der konstitutiv aktiven Kinase MKK4. Überexpression des Proteins MDG 138 induzierte die signifikante Zunahme der Zellfläche.

Die nachfolgende Auswertung des Streudiagramms verdeutlichte, dass die Proteine MDG136 und die Kinase MKK4 eine elongierte Morphologie verursachten. Im Vergleich zur Kontrollpopulation (Überexpression von CFP) nahm der Anteil der Zellen im Bereich der elongierten Morphologie von 20 % auf 23 % bzw. 25 % zu. Gleichzeitig sank der Anteil an Zellen mit flächiger Morphologie von 20 % auf 13 % bzw. 12 %. Die Reduktion des Anteils großflächiger Zellen physiologischer Morphologie deutete auf eine Verringerung der Zellgröße hin. Diese mit der maladaptiven Hypertrophie assoziierte Zellform korrelierte mit den im Abschnitt „Ergebnisse 3.1.3.2“ visuell bestimmten Morphologien.

Die Überexpression des Proteins MDG138 führte hingegen zu einer vergrößerten, hypertrophen Morphologie. Der Anteil der Zellen mit flächiger Zellform stieg von 20 % auf 42 % an, der Anteil elongierter Zellen nahm von 20 % auf 5 % ab. Auch diese mit der adaptiven Hypertrophie assoziierte Morphologie bestätigte die zuvor im Abschnitt „Ergebnisse 3.1.3.2“ subjektiv ermittelte Zellform. Die morphologischen Analysen werden in der Abbildung 57 wiedergegeben.

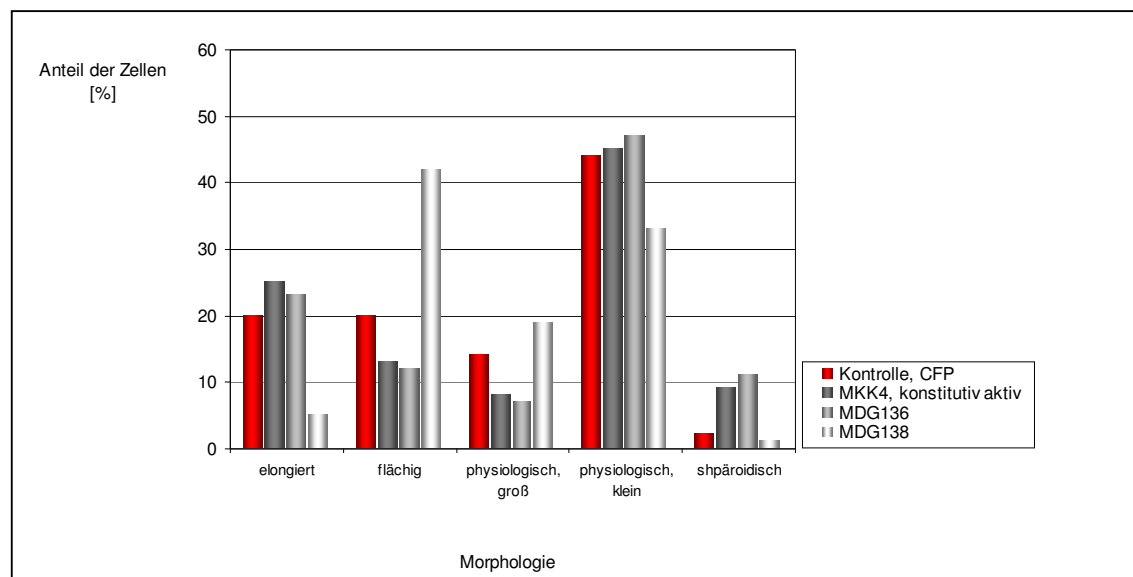


Abbildung 57: Charakteristische Morphologien von Kardiomyozyten nach rekombinanter Expression (Auswertung charakteristischer Regionen des LSC-Streudiagramms)

In primären Kardiomyozyten wurden rekombinante Proteine exprimiert, die pathologische Morphologien induzierten. Das Protein MDG136 und die konstitutiv aktive Mutante MKK4 verursachten eine Elongation der Zellen. Die Veränderungen der Zellzahl in den Bereichen elongierte Morphologie (Zunahme von 20 % auf 23 % bzw. 25%) bzw. flächige Morphologie (Abnahme von 20 % auf 13 % bzw. 12%) bestätigten dies. Das Protein MDG138 führte zu einer vergrößerten, flächigen Morphologie. Im Diagramm nahm der Anteil der Zellen mit flächiger Morphologie von 13 % auf 42 % zu.

Anhand von Zellpopulationen mit definierter pathologischer Morphologie konnte somit die Methode der morphologischen Zellanalyse mittels LSC validiert werden. Durch Statistik der ermittelten Daten konnten die Unterschiede mehrerer Verteilungen auf Signifikanz überprüft werden. Die anschließende Auswertung der Zellparameter Fläche und Umfang im Streudiagramm ermöglichte eine detaillierte Aussage über die morphologische Verteilung einer Zellpopulation.

4.2. Analyse der Morphologie nach Transduktion mit cDNA-Pools

Im Rahmen der Expressionsklonierung wurden, wie in Abschnitt „Ergebnisse 2.2.“ beschrieben, 288 Adenoviruspools zur rekombinanten Expression von cDNAs aus humanem Herzgewebe generiert. Primäre Kardiomyozyten wurden mit den rekombinanten Viren transduziert und die rekombinante Expression durch Zugabe von RU486 induziert. Die 288 Zellpopulationen wurden anschließend fixiert und ausgewertet. Nach einer visuellen Vorselektion wurden die Zellen im LSC gescannt. Nach statistischer Analyse und Auswertung der Streudiagramme wurden 8 rekombinante Adenoviruspools detektiert, deren cDNAs pathologische oder hypertrophe Morphologien induzierten. Die vier Viruspools #44, #57, #90 und #216 verursachten den Phänotyp der maladaptiven Hypertrophie mit charakteristischer Elongation der Zellen und Reduktion der Zellgröße. Die von den Viruspools #14 und #132 hervorgerufenen pathologischen Phänotypen waren durch Heterogenität und Verkleinerung der Zellfläche geprägt. Die Viruspools #99 und #110 führten in transduzierten Kardiomyozyten zur Ausbildung großflächiger, homogener Zellen. Rekombinante Proteine dieser Pools schienen daher mit der adaptiven Hypertrophie assoziiert zu sein. Die statistische Analyse der 8 rekombinanten Adenoviruspools wird in Abbildung 58 wiedergegeben.

Die Expressionsklonierung in Kardiomyozyten ermöglichte folglich die Detektion von cDNAs, die potenziell mit der Pathogenese der Herzinsuffizienz assoziiert sind. Wegen der guten Eignung des Vektorsystems zur effizienten Herstellung der Viruspools und Transduktion von Kardiomyozyten sowie der automatisierten Routine zur Analyse der Morphologie konnten in diesem Screen mehr als 3.000 cDNAs aus dem humanen Herzen analysiert werden.

Im folgenden Abschnitt „Ergebnisse 5.“ wird nun die detaillierte Analyse eines Hypertrophie induzierenden cDNA-Pools dargestellt.

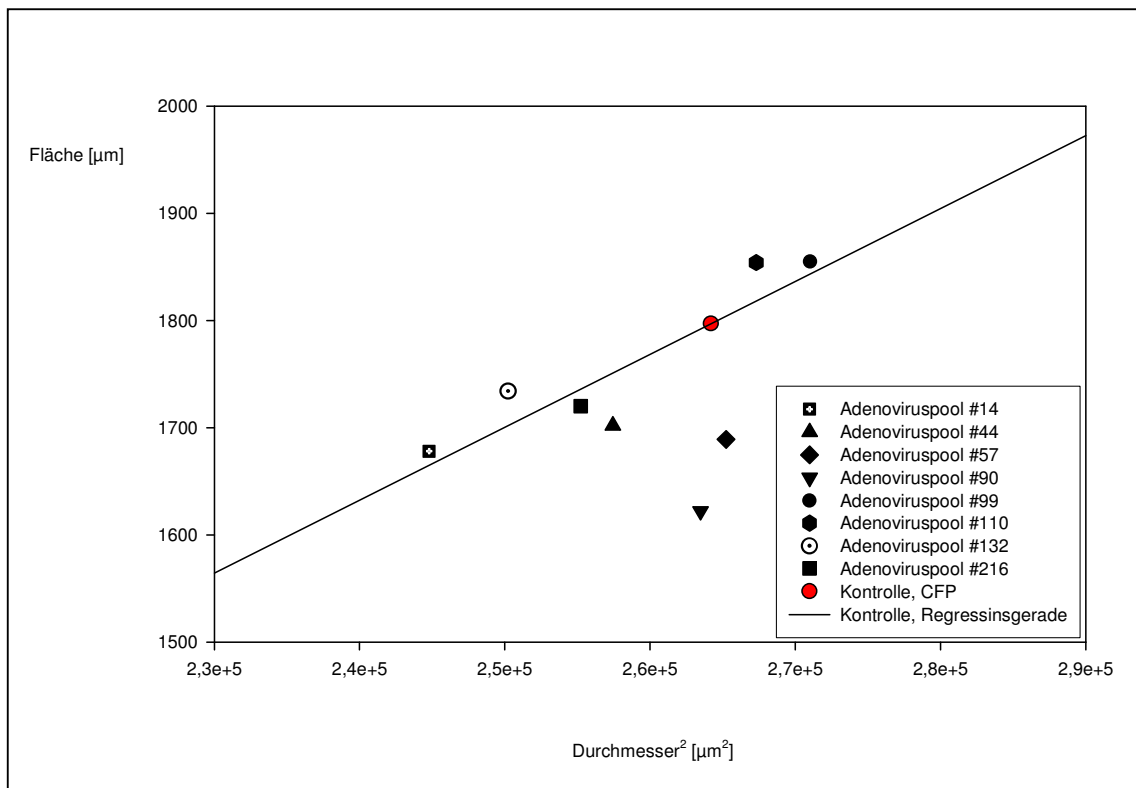
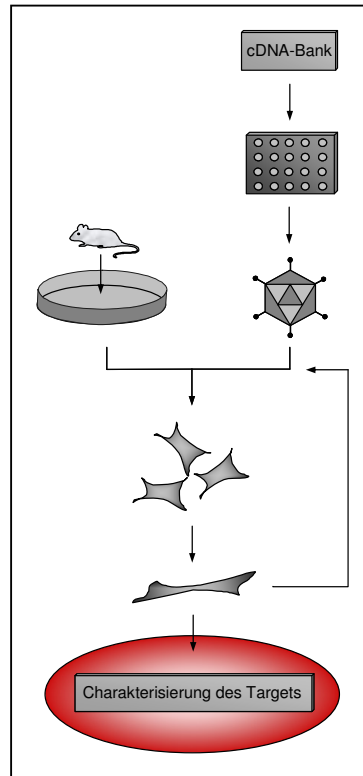


Abbildung 58: LSC-Analyse von Kardiomyozytenpopulationen nach Transduktion mit rekombinanten Adenoviruspools (Statistische Auswertung der Verteilungen für Zellfläche und Zellumfang)

Primäre Kardiomyozyten wurden mit 288 rekombinanten Adenoviruspools transduziert. Während eines LSC-Screenings wurden die Zellpopulationen morphologisch analysiert. Hierbei wurden 8 rekombinante Adenoviruspools detektiert, die pathologisch relevante Morphologien induzierten. Die cDNAs der Pools #99 und #110 verursachten den Phänotyp der adaptiven Hypertrophie, die cDNAs der Pools #44, #57#, #90 und #216 riefen den Phänotyp der maladaptiven Hypertrophie hervor. Die durch cDNAs der Pools #14 und #132 hervorgerufenen Phänotypen waren durch Heterogenität und kleine Zellflächen gekennzeichnet. Die 8 Zellpopulationen unterschieden sich im Parameter Fläche oder Umfang signifikant vom Wert der Kontrollgruppe (Zellpopulation mit rekombinant exprimiertem CFP).

5. Funktionelle Charakterisierung von Translin



Nachdem im Rahmen der Expressionsklonierung acht Adenoviruspools signifikante morphologische Effekte in primären Kardiomyozyten hervorriefen, wurde exemplarisch ein Pool zur detaillierten funktionellen Analyse herangezogen. Hierzu wurden die 12 cDNAs des mit der adaptiven Hypertrophie assoziierten Adenoviruspools #99 separat untersucht. Alle cDNAs wurden in den drei möglichen Leserastern in Viruspartikel (regulierbares Adenovirussystem AV pKA3) verpackt. Nach Transduktion von Kardiomyozyten mit den resultierenden 36 cDNA-Konstrukten wurden die Zellpopulationen morphologisch analysiert. LSC-Analyse und anschließende Bestimmung der Nukleinsäuresequenz zeigten, dass allein die Expression der cDNA des trunkierten Proteins Translin eine großflächige, homogene Zellform induzierte. Der Effekt war statistisch signifikant und spiegelte die bereits durch den rekombinanten Adenoviruspool #99 in Kardiomyozyten verursachte Morphologie verstärkt wieder.

5.1. Struktur- / Funktionsbeziehung von Translin

Translin (Maus-Homolog: Testis brain RNA binding protein, im Folgenden als WT-Translin bezeichnet) ist ein DNA / RNA-bindendes Protein, welches in Vorgängen der chromosomalen Translokation, des mRNA-Transports und der Regulation der Translation involviert ist. Es besitzt ein Molekulargewicht von 26 Kd und besteht aus 228 Aminosäuren, die in funktionelle Domänen untergliedert werden. Die basischen Proteindomänen AS 56 – AS 64 und AS 86 – AS 97 sind für die Bindung der Nukleinsäuren essentiell. Das nukleäre Exportsignal der Aminosäuren 147 – 157 spielt eine Rolle bei der subzellulären Lokalisation des Proteins. Eine GTP-Bindungsdomäne des Aminosäurebereichs 159 – 163 dient der allosterischen Kontrolle der Nukleinsäurebindung. Die C-terminal anschließende Dimerisierungsdomäne (AS 177 – AS 218) ist zur Ausbildung von Translin-Multimeren notwendig. Eine Dimerisierung der Proteine ist für die Nukleinsäurebindung notwendig, aber nicht hinreichend (Chennathukuzhi et al., 2001; Han et al., 1995; Wu et al., 1998).

Die im Screen detektierte cDNA kodierte jedoch nicht für das gesamte offene Leseraster von Translin. Die Expression führte zu einem trunkierten Protein, bestehend aus den Aminosäuren 150 – 228 von Translin (im Folgenden als Δ -Translin bezeichnet). Das Protein verfügte somit

über keine Nukleinsäurebindungsdomänen, das nukleäre Exportsignal war trunziert. Die GTP-Bindungsdomäne sowie die Dimerisierungsdomäne wurden jedoch vollständig exprimiert. Die schematische Struktur von Translin als natives bzw. trunziertes Protein wird in der Abbildung 59 dargestellt.

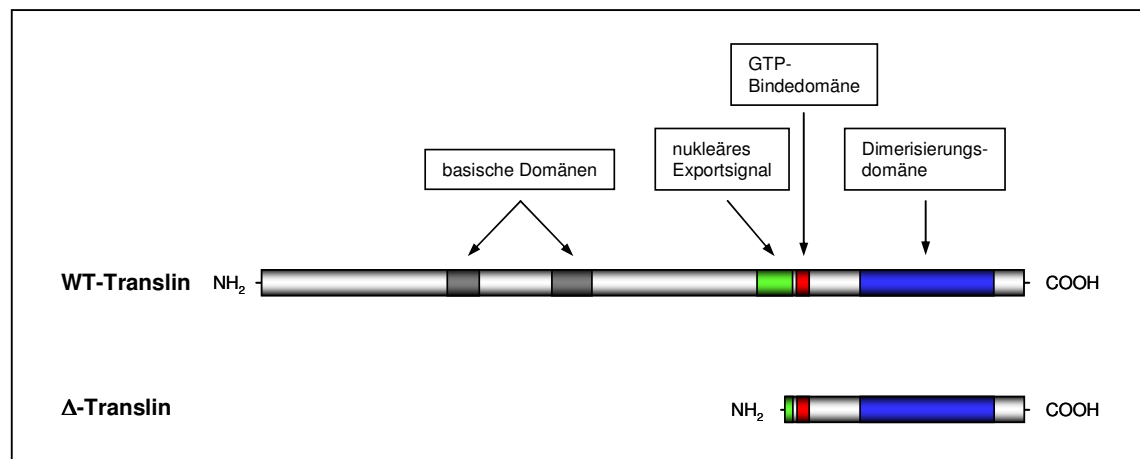


Abbildung 59: Schematische Darstellung des Proteins Translin

Das obere Schema zeigt den Aufbau des nativen Proteins WT-Translin mit einer Länge von 228 Aminosäuren. Seine basischen Domänen (AS 56 – AS 64 und AS 86 – AS 97) dienen der Nukleinsäurebindung. Das nukleäre Exportsignal (AS 147 – AS 157) reguliert die subzelluläre Lokalisation. Eine GTP-Bindungsdomäne (AS 159 – AS 163) reguliert die Bindung der Nukleinsäuren allosterisch. Über die Domänen der Aminosäuren AS 177 – AS 218 kann Translin Homodimere ausbilden.

Während der Expressionsklonierung wurde die im unteren Schema dargestellte trunzierte Form Δ-Translin isoliert (AS 150 – AS 228). Sie verfügte nur über die vollständige GTP-Bindungsdomäne sowie den Aminosäurebereich zur Dimerisierung.

Um sowohl Δ-Translin aus der Expressionsklonierung als auch das entsprechende native Protein zu charakterisieren, wurde die für den vollständigen offenen Leserahmen kodierende Gensequenz von WT-Translin aus einer cDNA-Bank des humanen Herzens isoliert und ebenfalls in das regulierbare adenovirale Expressionssystem AV pKA3 integriert (Aoki et al., 1995).

Nach Transduktion primärer Kardiomyozyten wurden die von Translin induzierten morphologischen Effekte analysiert. Die im LSC ermittelten Parameter Zellfläche und Zellumfang der mit „AV pKA3 WT-Translin“ bzw. „AV pKA3 Δ-Translin“ transduzierten Populationen wurden mit der Kontrollgruppe „AV pKA3“ (rekombinante Expression

von CFP) verglichen. Der Mann-Whitney-Test bewies innerhalb der drei Populationen statistisch signifikante Unterschiede für beide Zellparameter. Der Vergleich der Mediane deutete auf eine Vergrößerung der Zellfläche nach rekombinanter Expression von Δ -Translin hin. In Kardiomyozyten rekombinant exprimiertes WT-Translin schien hingegen durchschnittlich kleinere, elongierte Zellformen zu induzieren. Die statistische Auswertung wird in Abbildung 60 graphisch dargestellt.

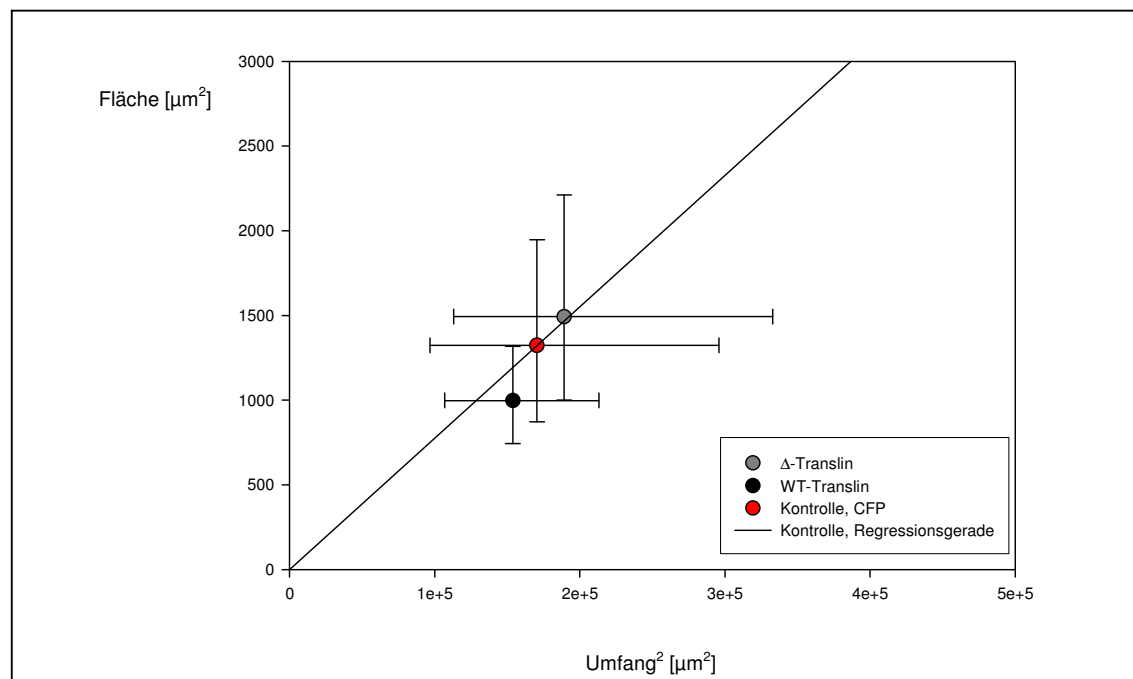


Abbildung 60: LSC-Analyse von Kardiomyozytenpopulationen nach Transduktion mit WT-Translin (AS 1 – AS 228) bzw. Δ -Translin (AS 150 –AS 228) (Statistische Auswertung der Verteilungen für Zellfläche und Zellumfang)

In primären Kardiomyozyten wurde die in der Expressionsklonierung isolierte trunkierte Form Δ -Translin sowie die native Form des Proteins WT-Translin rekombinant exprimiert. Der Mann-Whitney-Test bewies eine signifikante Zunahme von Zellfläche und –umfang nach Expression von Δ -Translin. WT-Translin führte hingegen zu kleineren, elongierten Zellformen.

Die Auswertung der Daten des Streudiagramms ermöglichte anschließend eine detaillierte morphologische Analyse der Kardiomyozyten. Deutlich erkennbar induzierte das trunkierte Translin in Kardiomyozyten den Phänotyp der adaptiven Hypertrophie. Der Anteil großflächiger Zellen nahm hierbei von 20 % auf 29 % zu, während der Anteil kleiner Zellen von 43 % auf 32 % abnahm.

Die rekombinante Expression des Proteins WT-Translin war hingegen mit der maladaptiven Hypertrophie assoziiert. Der Anteil der Zellen mit großflächiger Morphologie sank von 20 % auf 1 % ab, der Anteil von Kardiomyozyten mit elongierter Morphologie verdoppelte sich hingegen auf 40 %. Zusätzlich wiesen die Veränderungen der Anteile großer bzw. kleiner Zellen auf eine Verringerung der Zellgröße von Kardiomyozyten mit physiologischer Morphologie hin. Die Auswertung des Streudiagramms wird in Abbildung 61 dargestellt.

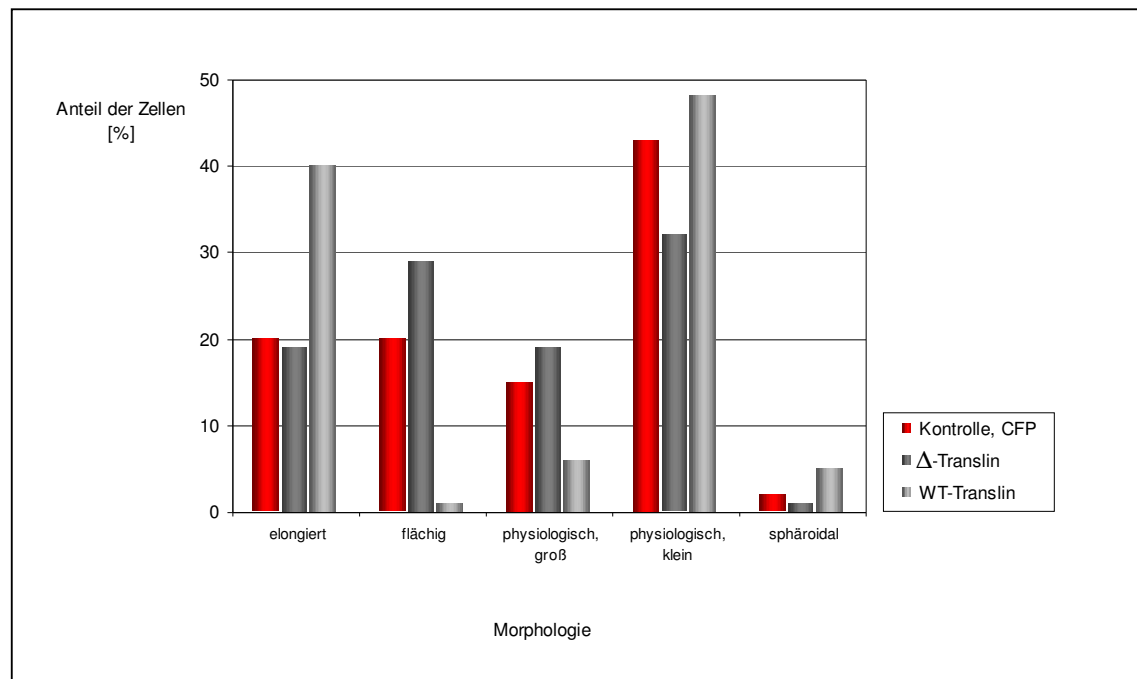


Abbildung 61: LSC-Analyse von Kardiomyozytenpopulationen nach Transduktion mit WT-Translin (AS 1 – AS 228) bzw. Δ -Translin (AS 150 –AS 228) (Auswertung charakteristischer Regionen des LSC-Streudiagramms)

In primären Kardiomyozyten wurde die in der Expressionsklonierung isolierte trunkierte Form Δ -Translin sowie die native Form des Proteins WT-Translin rekombinant exprimiert. Die Auswertung der Verteilungen für Zellfläche und –umfang zeigten eine Assoziation von Δ -Translin mit der adaptiven Hypertrophie. Im Vergleich zur Kontrollpopulation war der Anteil großflächiger Zellen von 20 % auf 29 % erhöht, der Anteil kleiner Zellen von 43 % auf 32 % reduziert. Die durch Expression von WT-Translin induzierte Morphologie war mit der maladaptiven Hypertrophie verknüpft. Der Anteil elongierter Kardiomyozyten verdoppelte sich, während der Anteil großflächiger Zellen von 20 % auf 1 % absank.

Das im Expressionsklonierungssystem isolierte Protein Translin war somit *in vitro* an der Ausbildung pathologisch hypertropher Morphologien primärer Kardiomyozyten beteiligt. Die beiden in Struktur und Funktion differierenden Proteine WT-Translin und Δ -Translin induzierten jedoch abweichende Formen der Hypertrophie. Das dem nativen Protein entsprechende WT-Translin war mit der Ausbildung des Phänotyps der maladaptiven Hypertrophie assoziiert. Das in der Nukleinsäurebindungsdomäne deletierte Δ -Translin führte hingegen in Kardiomyozyten zum Phänotyp der adaptiven Hypertrophie. Die differenzielle Expression von Translin könnte somit einen elementaren Prozess während der Pathogenese des gesunden oder adaptiv hypertrophen zum maladaptiv hypertrophen Herzen darstellen. Abschließend werden die charakteristischen Morphologien primärer Kardiomyozyten infolge rekombinanter Expression von Δ -Translin und WT-Translin in Abbildung 62 dargestellt.



Abbildung 62: Morphologie primärer Kardiomyozyten nach rekombinanter Expression von Δ -Translin bzw. WT-Translin (Zellanalyse im Fluoreszenzmikroskop)

In primären Kardiomyozyten wurde das in der Expressionsklonierung als Target identifizierte Protein Translin rekombinant exprimiert. Die N-terminal deletierte Mutante Δ -Translin induzierte eine für die adaptive Hypertrophie charakteristische, großflächige Zellform. Das Wildtyp-Protein Translin (WT-Translin) führte hingegen zur Ausbildung kleiner, elongierter Zellen, die den Phänotyp der maladaptiven Hypertrophie reflektierten.

5.2. Assoziation mit der humanen Erkrankung

Um eine potenzielle *in vivo* Assoziation von Translin während der Pathogenese der Herzinsuffizienz zu ermitteln, wurden Echtzeit-RT-PCR Analysen zur Bestimmung des Expressionsprofils im humanen Herz durchgeführt. Hierzu wurde die RNA von fünf gesunden sowie fünf an DCM erkrankten humanen Herzen untersucht (siehe Abbildung 63). Die statistische Auswertung der Daten bewies eine signifikant um den Faktor 1,7 erhöhte Transkriptionsrate von Translin im erkrankten Herz ($p = 2,5 \times 10^{-5}$ im Wilcoxon Test). Die differenzielle Expression von Translin im gesunden und erkrankten Organ wird in Abbildung 64 dargestellt.

In vivo ist daher die Pathologie des maladaptiv hypertroph erkrankten DCM-Herzen durch eine verstärkte Transkription des Translin-Gens gekennzeichnet.

Individuum	Diagnose	Geschlecht	Alter [Jahre]	Medikation	Explantation
Kontrollgruppe, gesundes Herz					
KN4	Hirntrauma	m	33	Arterenol, KCl	08.06.1997
KN6	unbekannt	unbekannt	unbekannt	unbekannt	06.07.1997
NF14	unbekannt	f	58	unbekannt	
NF15	unbekannt	m	38	unbekannt	
NF17	unbekannt	f	58	unbekannt	25.04.1996
Dilatative Kardiomyopathie					
#32	DCM nach Myokarditis	unbekannt	unbekannt	unbekannt	21.10.1998
#52	DCM	unbekannt	unbekannt	unbekannt	09.03.1991
#84	DCM	m	58	unbekannt	19.10.1993
#88	DCM, angeborenes aortales Vitium	m	32	unbekannt	12.04.1993
#102	DCM	unbekannt	unbekannt	unbekannt	10.02.1996

Abbildung 63: Patientendaten der Gewebeproben zur RNA-Analyse

Um differenzielle Expressionsprofile von Translin im humanen Herzen zu ermitteln, wurde RNA aus apikalem Herzgewebe von fünf gesunden sowie fünf an dilatativer Kardiomyopathie (DCM) erkrankten Spendern isoliert.

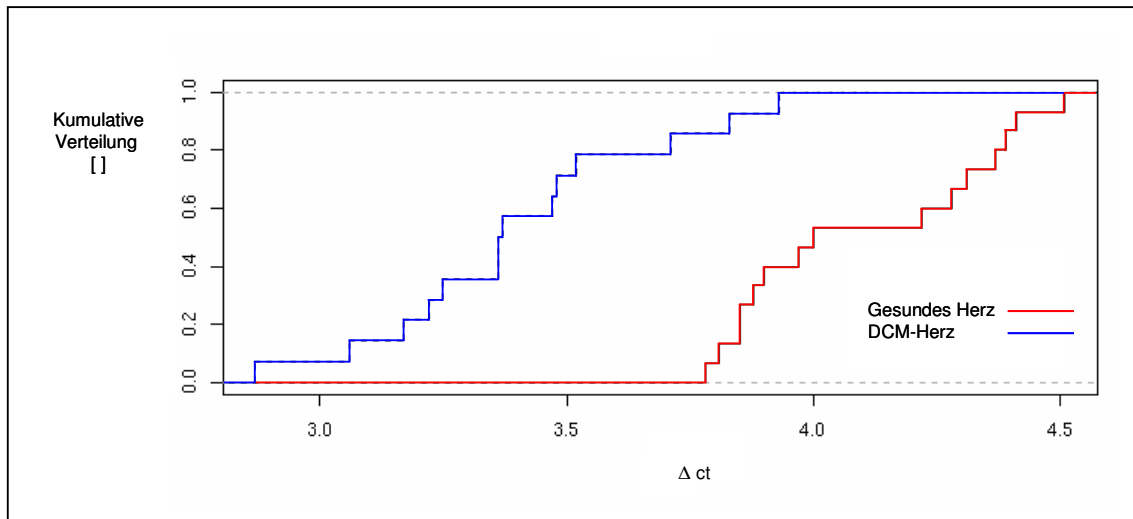


Abbildung 64: Kumulative Verteilungen des Amplifikationssignals von Translin (Statistische Analyse der Echtzeit-RT-PCR)

RNA-Proben von fünf gesunden und fünf an dilatativer Kardiomyopathie (DCM) erkrankten Patienten wurden mittels Echtzeit-RT-PCR auf differenzielle Expression von Translin untersucht. Die Analysen wurden als Triplikate durchgeführt. Die Verteilungen der spezifischen Amplifikationssignale von Translin wurden als kumulative Integrale dargestellt und zeigten die signifikant erhöhte Transkriptionsrate des Gens im DCM-Herz.

E. Diskussion

1. Das Expressionsklonierungssystem in primären Kardiomyozyten zur Detektion neuer Zielproteine der Herzinsuffizienz

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Screeningverfahren entwickelt, um funktionell mit der Herzinsuffizienz assoziierte Zielproteine („Targets“) zu detektieren. Zum Aufbau eines effizienten, zellbasierten Testsystems müssen hierbei folgende Grundkriterien erfüllt sein:

1. Das zu untersuchende biologische *in vivo* System muss durch spezifische *in vitro* Parameter des Assaysystems definierbar sein. Die im Assay ermittelten Daten sollen prädiktive Aussagen bezüglich der Funktion der ermittelten Zielmoleküle *in vivo* ermöglichen.
2. Um eine hohe Rate der Targetdetektion zu gewährleisten, muss eine quantitativ umfassende cDNA-Genbank (oder alternativ eine cDNA-, EST-, ORF-Bank bzw. eine Peptid-, Antikörper- oder chemische Wirkstoffbibliothek) zur Analyse im Testsystem zur Verfügung stehen.
3. Die Moleküle der Bibliothek müssen zur Analyse effizient in das *in vitro* System eingebracht werden. Hierzu ist gegebenenfalls die Etablierung geeigneter Vektor- oder Carriersysteme notwendig.
4. Das Screeningverfahren muss auf der reproduzierbaren und statistisch relevanten Analyse objektiver, biologischer Parameter beruhen. Zur Steigerung des Analysedurchsatzes ist die Möglichkeit der Automatisierbarkeit des Systems vorteilhaft.

Unter Berücksichtigung dieser Merkmale wird im folgenden Abschnitt die Etablierung des Expressionsklonierungssystems zur Targetfindung in primären Kardiomyozyten diskutiert.

1.1. Korrelation der Herzinsuffizienz *in vivo* mit zellulären Parametern *in vitro*

Die Insuffizienz des Herzens ist durch das Unvermögen gekennzeichnet, infolge hämodynamischen Stresses oder genetischer Mutation eine ausreichende Perfusion der peripheren Organe zu gewährleisten (Lips et al., 2003). Die kausalen Zusammenhänge, die zu den komplexen Veränderungen des Organs, wie Modulation der Signaltransduktion, Calcium-Homöostase, Expression embryonaler Gene sowie Fibrose und Onkose führen, konnten jedoch bisher nicht vollständig aufgeklärt werden (Gaballa und Goldman, 2002; Mittmann et al., 1998).

Das bedeutendste diagnostische Merkmal mit hoher Prädiktivität während der Entwicklung der Herzinsuffizienz stellt die Ausbildung der linksventrikulären Hypertrophie dar (Lips et al., 2003). Das Herz versucht hierbei, den pathologisch erhöhten, hämodynamischen Stress durch eine Zunahme der Myokardmasse zu kompensieren (James et al., 2000). Die resultierenden morphologischen Veränderungen des Organs können beispielsweise in *in vivo* Modellen des Hundes oder der Ratte reproduziert werden (Anand et al., 1997; Carabello, 2002; Cohn, 1995; Onodera et al., 1998; Tamura et al., 1998). Wegen des hohen Zeit-, Kosten- und Arbeitsaufwandes sind derartige Modellsysteme zur Anwendung in einem Screeningverfahren ungeeignet und auch unter ethischen Gesichtspunkten nicht vertretbar.

Auf Grund der Korrelation der makroskopischen Veränderungen des Herzens mit der Morphologie der Kardiomyozyten kann jedoch ein zelluläres *in vitro* System zur prädiktiven Analyse der Herzinsuffizienz herangezogen werden: Die konzentrische Hypertrophie der initialen adaptiven Phase des insuffizienten Herzens wird auf zellulärer Ebene durch eine Vergrößerung des Zellquerschnitts und der Zellfläche der Kardiomyozyten gekennzeichnet. Die exzentrische Hypertrophie des maladaptiven dekompensierten Organs wird hingegen durch eine Elongation der Zellen reflektiert. Diese morphologischen Veränderungen können sowohl im erkrankten Herz des Menschen, des Tiermodells als auch in Zellkultursystemen übereinstimmend belegt werden (Gerdes, 2002). In Kongruenz zu Literaturdaten konnten auch im Rahmen dieser Arbeit spezifische hypertrophe Phänotypen primärer Kardiomyozyten *in vitro* induziert und zur späteren Validierung des Screeningsystems verwendet werden

(Arnott et al., 1998; King et al., 1998; Ng et al., 2001; Nicol et al., 2001; Wollert et al., 1996). Eine durch das hypertrophe Agens Phenylephrin induzierte α -adrenerge Stimulation verursachte den Phänotyp der adaptiven Hypertrophie, während die Stimulation mit dem Zytokin LIF die elongierte Morphologie der maladaptiven Hypertrophie hervorrief. Weiterhin rief eine heterologe Expression bekannter, mit der Herzinsuffizienz assoziierter Proteine eine hypertrophe Zellform der Kardiomyozyten hervor. Diese pathologische Veränderung der Morphologie erwies sich als spezifisches Merkmal der primären Herzmuskelzellen und konnte in keiner weiteren untersuchten Zelllinie beobachtet werden.

Die *in vitro* Analyse der morphologischen Parameter primärer Kardiomyozyten stellt somit eine effiziente Methode zur Detektion pathologischer Stimuli (sowohl extrazellulärer Faktoren, wie Zytokine oder Neurohormone, als auch zellulär exprimierter Gene) im Zellkultursystem dar. Basierend auf der Korrelation des *in vitro* Systems mit der Pathologie *in vivo* können prädiktive Aussagen bezüglich der Assoziation spezifischer Targets mit der humanen Erkrankung getroffen werden. In der praktischen Durchführung der Expressionsklonierung wurden daher primäre Kardiomyozyten nach Transduktion mit cDNAs des humanen Herzens auf pathologische Morphologien untersucht.

1.2. Charakteristik einer cDNA-Bibliothek zur Analyse herzspezifischer Gene in primären Kardiomyozyten

Es gilt als erwiesen, dass die diskutierte Pathologie des insuffizienten Herzens durch signifikante Veränderungen auf Ebene der myokardialen Gen- und Proteinexpression vermittelt wird (Dunn, 2000). Die funktionelle Analyse der Gene und Genprodukte des humanen Herzens kann daher als effiziente Methode dienen, neue, mit der Herzinsuffizienz assoziierte Zielproteine zu detektieren (Hwang et al., 2001).

Daher wurde für die vorliegende Arbeit eine cDNA-Bank des humanen Herzens generiert, um eine möglichst umfassende, genomweite Analyse der Genprodukte in primären Kardiomyozyten zu ermöglichen. Die Etablierung und Validierung einer derartigen cDNA-Bibliothek aus definierten Gewebeproben des gesunden und insuffizienten Organs stellt hierbei jedoch eine hohe technische Herausforderung dar (Cho und Nuttall, 2002; Tyers und Mann, 2003). In Kooperation mit Kliniken und biopharmazeutischen Unternehmen konnte diese Aufgabe erfüllt werden.

Ein nachteiliger Aspekt bei der Verwendung einer cDNA-Bank zur effizienten Genanalyse besteht jedoch in der inhomogenen Redundanz der Transkripte. In einer cDNA-Bibliothek somatischer Zellen variiert die Anzahl der Transkripte zwischen 1 - 5.000 Kopien pro Gen (Soares et al., 1994). Literaturdaten zufolge sind in einer Genbank aus Kardiomyozyten die Transkripte des kontraktilen Apparates sowie des Energiestoffwechsels überrepräsentiert, weiterhin kodieren etwa 40 % der bekannten Gene einer cDNA Bank des Herzens für mitochondriale Proteine (Tanaka et al., 1996). Um die Abundanz überrepräsentierter Gene zu reduzieren und gleichzeitig die effiziente Analyse schwach exprimierter Gene der Bibliothek zu ermöglichen, wurde daher eine Normalisierung der cDNA-Bank des humanen Herzens vorgenommen (Diatchenko et al., 1996; Kudoh et al., 2001), (Internationales Patent WO 99 / 15702). Die Eigenschaften der Genbank wurden anschließend qualitativ und quantitativ überprüft. Neben den in der Literatur beschriebenen Methoden zur Charakterisierung der cDNA-Bibliothek wie Kolonie-Hybridisierungs- und Sequenzanalyse, wurden zusätzlich Hybridisierungsexperimente mit einem DNA-Microarray vor und nach der

Normalisierung durchgeführt (Carninci et al., 2000; Kohchi et al., 1995; Kudoh et al., 2001; Soares et al., 1994; Yao et al., 2002).

Die aus 3×10^7 Klonen bestehende normalisierte cDNA-Bibliothek enthielt mit hoher statistischer Wahrscheinlichkeit alle potenziellen Transkripte des Herzgewebes, die durchschnittliche Länge der cDNAs von 1,2 Kb entsprach vergleichbaren Literaturwerten (Soares et al., 1994). Die Sequenzanalyse von 1.355 Klonen zeigte, dass 87 % der cDNAs für verschiedene Genbereiche kodieren. In der Literatur beschriebene cDNA-Banken weisen hier eine deutlich geringere Qualität mit etwa 50 % nicht-redundanter Sequenzen auf (Tanaka et al., 1996). Die DNA-Microarray-Analysen bewiesen die Effizienz der Normalisierung, durch die gezielt 140 hochredundante Transkripte für beispielsweise mitochondriale und kontraktile Proteine angereichert wurden (Verringerung des Hybridisierungssignals bis zu einem Faktor 100). 800 unterrepräsentierte Transkripte wurden dabei selektiv angereichert (Verstärkung des Hybridisierungssignals bis zu einem Faktor 100).

Um die Effizienz der nachfolgenden funktionellen Analyse der cDNAs in primären Kardiomyozyten zu erhöhen, wurden die Einzelklone der cDNA-Bank automatisiert in Pools zusammengefügt. Durch diese Verfahrensweise kann die Durchsatzgeschwindigkeit der späteren Analyse der cDNAs im zellulären System erhöht werden. Gleichzeitig verringern sich Arbeitsaufwand und Bedarf an limitierendem Zellmaterial (Michiels et al., 2002).

Die auf Gewebe des gesunden und insuffizienten humanen Herzens basierende normalisierte cDNA-Bibliothek wurde nach der beschriebenen Charakterisierung und Formatierung zur Transformation primärer Kardiomyozyten im Expressionsklonierungssystem eingesetzt.

Neben der in dieser Arbeit durchgeführten funktionellen Analyse im Zellkultursystem kann die cDNA-Bank auch in weiteren Assays der funktionellen Genomik und Proteomik (beispielsweise subtraktive Hybridisierungstechniken, Microarrayanalysen von Genexpressionsprofilen, Proteininteraktionsanalysen) universell eingesetzt werden (Ansuini et al., 2002; Bussow et al., 2000; Hwang et al., 2002).

1.2.1. Generierung eines viralen Vektorsystems zur Analyse der cDNA-Bibliothek in Kardiomyozyten

1.2.2. Adenoviren als Vektorsystem

Zur funktionellen Charakterisierung wurden primäre Herzmuskelzellen mit den Genen der humanen cDNA-Bank transformiert. Da sich jedoch Standardmethoden der Transfektion in primären Kardiomyozyten als ungeeignet erwiesen, wurde in der vorliegenden Arbeit ein adenovirales Vektorsystem (pKA3, pKA-Switch) zur effizienten Transduktion entwickelt (Gustafson et al., 1987; Wang et al., 1998), (Untersuchungen der Arbeitsgruppe Molekulare Kardiologie, MediGene AG, Martinsried). Im Gegensatz zur Mikroinjektion, transienten Transfektion oder Lipofektion kann mittels rekombinanter Adenoviren eine vollständige Transduktion primärer Herzmuskelzellen erzielt werden (Kass-Eisler et al., 1993; Wang und Huang, 2000).

Auf Grund der schnellen, effizienten Amplifikation und Aufreinigung sowie ihres *in vitro* Expressionsverhaltens (maximale, stabile Expression der rekombinanten Proteine bereits nach 48-72 h), sind rekombinante Adenoviren ideal für das in dieser Arbeit entwickelte Screeningverfahren mit hohem Durchsatz geeignet (Russell, 2000; Wang und Huang, 2000). Um die Replikation von Wildtyp-Adenoviren auszuschließen, wurde hierzu ein rekombinantes Adenovirusgenom verwendet, welches in den genomischen Bereichen E1 und E3 deletiert ist (Bett et al., 1995; Gao et al., 1996). Gleichzeitig wird durch die Deletion die Kapazität zur Integration von Fremd-DNA von 2 Kb auf 7 Kb erhöht und die Möglichkeit potenzieller Interaktionen zwischen Adenovirusgenom und rekombinanter Expressionskassette verringert (He et al., 1998; Steinwaerder und Lieber, 2000). Der potenzielle Einsatz alternativer viraler Vektorsysteme, wie beispielsweise „Gutless Adenoviren“, deren Genom in weiteren Sequenzbereichen deletiert ist, wurde als ineffizient angesehen (Schiedner et al., 2002; Steinwaerder et al., 1999). Die Erfordernis zusätzlicher Helferviren und die beschriebene Instabilität der Vektoren lassen ihre Verwendung in einem Screeningverfahren nicht zu (Russell, 2000).

1.2.3. Rekombinatorische Klonierung zur Integration von cDNAs

Die Generierung des rekombinanten Adenovirusgenoms stellt zum aktuellen Zeitpunkt noch immer eine zeit- und arbeitsintensive Methode dar. Die klassische Herstellung beruht auf der Integration des rekombinant zu exprimierenden Gens in ein Transferplasmid in *E. coli* und anschließender Rekombination mit dem Adenovirusgenom in Zellkultur. Die Selektion der rekombinanten Adenoviren erfolgt mittels Plaque-Assay (Danthinne und Imperiale, 2000). Neuere Systeme erlauben die Konstruktion des Transferplasmids sowie die homologe Rekombination mit dem adenoviralen Plasmid mit nachfolgender Selektion in *E. coli* (Chartier et al., 1996; He et al., 1998).

Weiterhin wurden Techniken entwickelt, um eine hohe Anzahl von Genen vereinfacht in Vektoren zu integrieren (Phizicky et al., 2003). Diese auf homologer Rekombination in *E. coli* bzw. Hefe oder Transposition beruhenden Methoden sind jedoch wegen spezifischer Zellkultursysteme und Selektionsschemata nicht universell einsetzbar (Hartley et al., 2000).

Beim gegebenen Stand der Technik erscheint keine Methode geeignet, die im Expressionsklonierungssystem geforderte Integration einer cDNA-Bibliothek in rekombinante Adenovirusgenome in einem angemessenen Zeit- und Arbeitsaufwand zu ermöglichen. Daher wurde in dieser Arbeit mittels komplexer, molekularbiologischer Strategien erstmals eine DNA-Sequenz in das rekombinante Adenovirusgenom eingefügt, welche die Integration von Genen mittels homologer *in vitro* Rekombination ermöglicht (Gateway-Rekombinationskassette, Invitrogen). Das Prinzip der so genannten rekombinatorischen Klonierung beruht auf der spezifischen Enzymreaktion der Rekombinasen des Bakteriophagen λ , die im Rahmen der Expressionsklonierung eine Integration von mehr als 10^2 cDNAs der Genbank in einem Zeitraum von zwei Stunden ermöglichte (Hartley et al., 2000). In Korrelation zu Literaturdaten war die Rekombinationsreaktion mit keiner signifikanten Fehlerrate behaftet und zusätzliche, systemspezifische Nukleinsäuresequenzen zeigten keinen nachweisbaren Einfluss auf die Produktion der Adenoviruspartikel oder die rekombinant exprimierten Proteine (Loftus et al., 2001).

Nach Insertion der Rekombinationskassette in das Adenovirusgenom und Herstellung der cDNA-Bank in einem entsprechenden Eingangsvektor zur rekombinatorischen Klonierung wurden in dieser Arbeit mehr als 3.600 cDNAs der Genbank des humanen Herzens spezifisch in das adenovirale Vektorsystem pKA3 integriert. Wegen seiner enormen Effizienz wird das Rekombinationssystem auch in weiteren Assays der funktionellen Genomik bis hin zu genomweiten Analyseverfahren eingesetzt (Braun et al., 2002; Reboul et al., 2001; Simpson et al., 2000; Walhout et al., 2000; Yokoyama, 2003), (Untersuchungen der Arbeitsgruppe Molekulare Kardiologie, MediGene AG, Martinsried).

1.2.4. Regulierbare Expression von cDNAs

Die cDNAs des rekombinanten Vektorsystems können potenziell für Proteine kodieren, die einen inhibitorischen Effekt auf die Virusreplikation oder den Metabolismus der Verpackungszelllinie ausüben. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Herstellung derartiger rekombinanter Viren bei konstitutiver Expression des toxischen Gens zu einer Reduktion des Titers führt oder sogar unmöglich ist (Edholm et al., 2001). Deshalb wurde in das adenovirale Vektorsystem pKA3 ein Promotor zur regulierbaren Expression der cDNA integriert. Ein ideales induzierbares Expressionssystem zeichnet sich durch minimale Basalaktivität des Promotors, hohe Expressionsrate im induzierten Zustand, Korrelation zwischen Expressionsrate und Dosis des Induktors sowie Inertheit des Induktors im *in vitro* bzw. *in vivo* System aus (Mills, 2001; Zoltick und Wilson, 2001). Erste Systeme beruhten auf endogenen, durch Hitzeschock, Metallionen oder Steroidhormone induzierbaren Promotoren, die in der Zelle jedoch pleiotrope Effekte ausübten und eine inakzeptable Basalaktivität aufwiesen.

Erst der Einsatz chimärer Transaktivatoren und heterologer, regulierbarer Promotoren führte zu einer wesentlichen Effizienzsteigerung der Systeme (Harvey und Caskey, 1998; Xu et al., 2003). Viele regulierbare Systeme erscheinen jedoch für den Einsatz im Expressionsklonierungssystem noch immer ungeeignet:

- Das Tetracyclin-regulierbare System weist eine hohe Basalaktivität auf.
- Die maximale Expressionsrate des Ecdyson-regulierbaren Systems ist gering, die Verwendung eines endogenen Rezeptors kann zur Interferenz mit der Signaltransduktion der Zelle führen.
- Das System der chemisch induzierten Dimerisierung eines heterologen Transaktivators benötigt drei Expressionskassetten. Die Induktoren können die endogene Signaltransduktion beeinflussen.

(Burcin et al., 1998; Mizuguchi und Hayakawa, 2001; Rossi und Blau, 1998)

Als geeignetes System wurde daher das Antiprogesteron-regulierbare Gene-Switch-System (Invitrogen) in das rekombinante Adenovirusgenom integriert, welches auf der Aktivierung eines chimären, modifizierten Hormonrezeptors durch das Antiprogesteron Mifepriston beruht. Literaturdaten zufolge weist das System im uninduzierten Zustand eine geringe basale Aktivität auf, nach Induktion wird durch Autoamplifikation des Transaktivators und Bindung an seinen spezifischen Promotorbereich eine hohe Expressionsrate erzielt (Burcin et al., 1998; Wang et al., 1997a; Wang et al., 1997b). Die Pharmakokinetik des Induktors Mifepriston ist hinreichend charakterisiert und führt bei den verwendeten Konzentrationen zu keinen endogenen Modifikationen der Zelle (Brogden et al., 1993; Wu et al., 1992).

Für die Expressionsklonierung wurde ein binäres System aufgebaut, welches aus einem rekombinanten Adenovirus zur Expression des Transaktivators (AV pKA-Switch) und einem zweiten Adenovirus zur regulierbaren Expression des heterologen Gens bestand (AV pKA3). Durch die Verwendung von zwei separaten Viren wird ein zusätzlicher Kontrollschritt zur Regulation der Expression mittels variabler Mengen des Transaktivators etabliert (Molin et al., 1998). Außerdem blieb die Kapazität des rekombinanten Adenovirus AV pKA3 erhalten, um cDNAs bis zu einer Größe von 3 Kb zu integrieren.

Untersuchungen in primären Kardiomyozyten im Rahmen dieser Arbeit zeigten, dass die Expression des induzierbaren Vektorsystems proportional zur Mifepristondosis reguliert werden konnte. Die maximale Expression entsprach 10 % der Expressionsstärke des konstitutiven CMV-Promotors. Dieser Wert war jedoch hinreichend, um in primären Kardiomyozyten signifikante, morphologische Veränderungen durch rekombinante

Expression zu induzieren. In Herzmuskelzellen war außerdem im uninduzierten Zustand keine Basalaktivität messbar (Quantifizierung der β -Galaktosidase-Expression). Dieses Ergebnis übertraf die Literaturdaten, die eine geringe Basalaktivität des Antiprogesteron-regulierbaren Systems in viralen Vektoren sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beschreiben (Edholm et al., 2001; Rossi und Blau, 1998).

Basierend auf diesem Resultat wurde untersucht, ob das adenovirale Vektorsystem pKA3 im uninduzierten Zustand auch die erforderliche Generierung von Viren mit rekombinanten, toxischen Genen ermöglichte. Hierzu wurden mittels Rekombination Gene in das Adenovirusgenom integriert, deren Proteine die Virusamplifikation durch unphysiologische Spleißvorgänge (Expression des Spleißfaktors ASF) verringern bzw. die Proteinsynthese der Wirtszellen durch Degradation der Transkripte (Expression einer RNase) unterbinden (Fu et al., 1992; Zuo und Manley, 1994). Beide Genome konnten anschließend in Viruspartikel verpackt werden, ohne eine Reduktion des Virustiters zu verursachen. In der Literatur beschriebene regulierbare Vektorsysteme zeigen hingegen, dass bereits die Verpackung des für den moderat toxischen Spleißfaktor ASF kodierenden Adenovirusgenoms im uninduzierten Zustand zu einer 20fachen Reduktion des Titers führt (Edholm et al., 2001; Molin und Akusjarvi, 2000). Demzufolge war das induzierbare Vektorsystem pKA3 auch unter diesem Aspekt vergleichbaren viralen Systemen überlegen.

Das neu entwickelte, regulierbare adenovirale Expressionssystem (pKA3, pKA-Switch) erwies sich im Rahmen der Expressionsklonierung als geeignet, Pools rekombinanter Adenovirusgenome mit jeweils 12 cDNAs der Genbank des humanen Herzens verlustfrei in Viruspartikel zu überführen. Reproduzierbar hohe Titer und spezifische PCR-Analysen bewiesen, dass Quantität und Qualität der Viruspools nicht durch artifizielle Effekte potenziell toxischer cDNAs beeinflusst wurde.

1.2.5. Finale Generierung und Verwendung des regulierbaren adenoviralen Vektorsystems pKA3

Neben dem beschriebenen regulierbaren Promotorbereich und der Rekombinationskassette wurde in den Vektor pKA3 ein zweites Cistron zur konstitutiven Expression des Cyanfluoreszierenden Proteins CFP integriert. Das Markerprotein diente sowohl der Kontrolle der Virusamplifikation in permissiven HEK-Zellen als auch der Transduktion primärer Kardiomyozyten während der Expressionsklonierung.

Weiterhin wurden auch die Nukleinsäuresequenzen des Replikationsstarts, des Centromers und des His-Selektionsmarkers aus *S. cerevisiae* in das Adenovirusgenom integriert. Dadurch konnte der Vektor in Hefezellen repliziert und beispielsweise durch Rekombination modifiziert werden. Dieses Verfahren erwies sich bei dem 36 Kb großen Vektor mit nur wenigen, singulären Nukleinsäuresequenzen für Restriktionsendonukleasen zur molekulargenetischen Modifikation als sehr effizient (Ketner et al., 1994), (Untersuchungen der Arbeitsgruppe Molekulare Kardiologie, MediGene AG, Martinsried).

Zusätzlich zu dem in dieser Arbeit verwendeten regulierbaren Expressionssystem pKA3 wurden noch drei weitere virale Vektoren pKA1, pKA2 und pKA4 generiert, die der weiteren Charakterisierung rekombinanter Proteine durch konstitutive Expression bzw. Expression als CFP-Fusionsprotein dienten.

Da die Expressionsdauer und -stärke der beiden rekombinanten Cistrons durch spezifische Sequenzbereiche des Virusgenoms signifikant beeinflusst werden, wurde versucht, diesen Effekt durch optimiertes Vektordesign zu minimieren (Lam und Breakefield, 2000; Schiedner et al., 2002; Shi et al., 1997). Um die Interferenz regulatorisch wirkender Virussequenzen mit der induzierbaren Expressionskassette zu reduzieren, wurde diese distal und in invertierter Transkriptionsrichtung zum Bereich der Inverted Terminal Repeats (ITR), des Enhancerbereichs der Gene E1A und pIX in das Adenovirusgenom integriert (Rubinchik et al., 2000; Steinwaerder und Lieber, 2000). Der Einbau von Insulatoren zur Abschirmung der heterologen Sequenzbereiche war auf Grund limitierter Kapazität des Vektors nicht

praktikabel (Burcin et al., 1999; Emery et al., 2000; Rivella et al., 2000). Der Vergleich mit in der Literatur untersuchten Vektoren lässt jedoch die Vermutung zu, dass durch die zweite konstitutive Expressionskassette eine zusätzliche Isolation des induzierbaren Promotors von distalen, transaktivierenden Sequenzen erzielt wurde (Steinwaerder und Lieber, 2000).

Nach seiner Etablierung und Charakterisierung wurde das regulierbare adenovirale Vektorsystem zur Expressionsklonierung in primären Kardiomyozyten eingesetzt. 288 cDNA-Pools bestehend aus jeweils 12 cDNAs der normalisierten Genbank des humanen Herzens wurden mittels homologer Rekombination in das oben diskutierte induzierbare Vektorsystem pKA3 integriert. Da jedoch der korrekte Leseraster der cDNAs zur Kodierung der Aminosäuren unbekannt war, wurden die cDNAs eines Pools jeweils mit den drei Vektoren pKA3 a, b und c rekombiniert, welche die spätere Expression der 12 cDNAs in allen drei Leserastern erlaubten. Im uninduzierten Zustand konnten die Pools anschließend in transkomplementierenden HEK293-Zellen zu Viruspartikeln verpackt werden. Nach Aufreinigung und Titerbestimmung wurden primäre Kardiomyozyten mit den Virus pools transduziert. Die Expression der insgesamt 36 rekombinanten Proteine eines Pools erfolgte durch sekundäre Infektion der Zellen mit dem für den Transaktivator kodierenden Adenovirus (AV pKA-Switch) und Induktion der Transkription durch Mifepriston. Die Herzmuskelzellen wurden anschließend morphologisch analysiert. Um hierbei virusinduzierte, morphologische Effekte in Kardiomyozyten durch Aktivierung spezifischer Signaltransduktionswege auszuschließen, wurden die Zellen stets im Vergleich zur Negativkontrolle (nicht induzierte, virustransduzierte Kardiomyozyten) analysiert (Greber, 2002; Li et al., 1998a; Li et al., 1998b; Suomalainen et al., 2001; Tibbles et al., 2002).

Neben dem effizienten Einsatz im Expressionsklonierungssystem primärer Kardiomyozyten kann das virale Vektorsystem (pKA3, pKA-Switch) auch zur funktionellen Analyse heterologer Proteine in allen weiteren *in vitro* Zellsystemen verwendet werden, die eine ausreichende Transduktionsrate aufweisen (Keyes und Mills, 2003; Xu et al., 2003; Zoltick und Wilson, 2001). In biopharmazeutischen Screeningverfahren werden derartige Vektorsysteme bereits zur Expressionsanalyse in krankheitsassoziierten Zellsystemen genutzt (Michiels et al., 2002).

Zur Validierung der *in vitro* gewonnenen Ergebnisse kann das adenovirale Expressionssystem auch *in vivo* eingesetzt werden (Mills, 2001). Bekannte Techniken des effizienten, organspezifischen Gentransfers und die Möglichkeit der regulierbaren Expression heterologer Proteine in physiologisch relevanten Konzentrationen ermöglichen die Charakterisierung von Zielproteinen, die Etablierung krankheitsassoziierter Tiermodelle oder *in vivo* Experimente zur somatischen Gentherapie (Agha-Mohammadi und Lotze, 2000; Ngan et al., 2002; Wright et al., 2001).

Auf Grund der mangelhaften Wirksamkeit der adenoviralen Gentherapie in klinischen Untersuchungen und immunologischer Nebenwirkungen, kann jedoch zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht von einer therapeutischen Anwendung des adenoviralen Expressionssystems ausgegangen werden (Russell, 2000).

Das regulierbare, adenovirale Vektorsystem pKA wurde wegen seines hohen Nutzens in der biotechnologischen Forschung und Entwicklung zum internationalen Patent angemeldet (vorläufige Patentnummer 60 / 470, 918). Weiterhin wurde das Vektorsystem in einem Screeningverfahren zur RNA-Antisense-Selektion im Rahmen einer Patentanmeldung beschrieben (Patentnummer DE 10210284).

1.3. Entwicklung eines automatisierten Screeningverfahrens zur morphologischen Analyse der Kardiomyozyten

Nachdem 3.456 cDNAs der normalisierten Genbank des humanen Herzens in das regulierbare adenovirale Expressionssystem pKA3 integriert worden waren, wurde ein Verfahren zur funktionellen Charakterisierung der entsprechenden rekombinanten Proteine etabliert.

Genomische Methoden, wie beispielsweise DNA-Microarrayanalyse, wurden für diese Aufgabenstellung nicht in Betracht gezogen. Derartige Verfahren finden zwar eine breite biopharmazeutische Anwendung bei der initialen Detektion neuer Zielproteine; sie ermöglichen auf Grund der geringen Korrelation zwischen Genregulation und Proteinexpression jedoch keine direkte Aussage bezüglich der funktionellen Bedeutung eines potenziellen Targets (Dunn, 2000; Hauptschein et al., 2002).

Zur direkten Analyse der Proteine wurden daher zahlreiche Screeningverfahren der Proteomik entwickelt. Methoden zur Bestimmung der Sequenz, Interaktion oder biochemischen Aktivität ermöglichen Aussagen zur Struktur und Funktion von Peptiden oder Proteinen (MacBeath und Schreiber, 2000; Martzen et al., 1999; Uetz et al., 2000). Da diese Daten zumeist in *ex vivo* Assays ermittelt werden, ist eine Aussage zur Proteinfunktion im zellulären, physiologischen Zusammenhang nur begrenzt möglich. Um die Funktionen spezifischer Proteine zu erkennen und im Kontext biologischer oder medizinischer Hypothesen zu untersuchen, sollte daher im Rahmen der Arbeit ein zellbasiertes Screeningverfahren generiert werden.

Die Funktion eines Proteins kann im Zellkultursystem durch seine spezifische Inaktivierung oder Überexpression untersucht werden (Hauptschein et al., 2002). Verfahren zur Proteininaktivierung beruhen auf den Prinzipien von Antisense-RNA, RNAi, der Interaktion mit pharmakologischen Molekülen oder genetischen Modifikation (De Backer et al., 2001; Elbashir et al., 2001; Liu et al., 1991). Zur Untersuchung der herzspezifischen Proteine im hohen Durchsatz wurde hingegen das Expressionsklonierungsverfahren zur heterologen Überexpression gewählt. Hierbei wurden primäre Kardiomyozyten mit Pools rekombinanter Adenoviren transduziert, die für cDNAs der normalisierten Genbank des humanen Herzens

kodierten. Nach Induktion der cDNA-Expression wurden die Zellen funktionell charakterisiert, um eine potenzielle Assoziation der rekombinanten Proteine mit der Herzinsuffizienz zu erkennen.

Das auf einer multiplen Ätiologie basierende Syndrom der Herzinsuffizienz kann im Zellkultursystem nicht durch einfache biochemische oder genetische Parameter hinreichend charakterisiert werden (Dunn, 2000). Als definierter pathologischer Marker der Erkrankung kann jedoch die bereits diskutierte hypertrophe Morphologie der Kardiomyozyten *in vitro* genutzt werden. Es wurde daher ein geeignetes Verfahren zur Bestimmung der Zellform primärer Kardiomyozyten entwickelt.

Um einen hohen Durchsatz der Zellanalyse bei objektiver, statistisch signifikanter Datenerfassung zu ermöglichen, wurden automatisierbare, computergestützte Analysemethoden verglichen. Die in der Literatur bekannten und in der Praxis überprüften Systeme zur automatischen Akquisition und Auswertung mikroskopischer Zellbilder wurden wegen zu geringer Analysegeschwindigkeit, großer Datenmengen und ineffizienter Software nicht in Erwägung gezogen (Bocker et al., 1996; Elliott et al., 2003; Kamentsky et al., 1997; Tibbe et al., 2002), (eigene Untersuchungen automatisierbarer Bildanalyseverfahren, Daten hier nicht aufgeführt). Als geeignetes System wurde schließlich das Laser Scanning Cytometer (LSC, CompuCyte) zur zytometrischen Analyse der primären Kardiomyozyten eingesetzt. Diese Technik ermöglicht es, individuelle, fluoreszenzmarkierte Objekte durch Laseranregung und Detektion der Fluoreszenzemission zu bestimmen.

Gegenüber anderen Methoden der fluoreszenzbasierten Zellanalyse weist dieses System bedeutende Vorteile auf (Claytor et al., 2001; Darzynkiewicz et al., 1999; Katsuragi und Tani, 2001; Tarnok und Gerstner, 2002):

- Automatische Analyse von Zellpopulation variabler Größe bei hoher Sensitivität, Genauigkeit (Auflösung: 0,5 µm im verwendeten Assay) und Arbeitsgeschwindigkeit (Analyse von 10³ Kardiomyozyten pro Stunde im verwendeten Assay)
- Möglichkeit der multiplen Reanalyse der gesamten Probe oder definierter Teilbereiche
- Nutzung der Fluoreszdaten zur Bestimmung der Zellmorphologie
- Relokalisation und mikroskopische Beurteilung individueller Zellen der Probe zur optischen Überprüfung der Analyse

Zur praktischen Analyse der Morphologie wurden die transduzierten Kardiomyozyten auf dem Objektträger fixiert und anschließend mittels LSC vermessen. Die Parameter Zellfläche, Zellumfang sowie der Formfaktor $\frac{c \cdot \text{Zellfläche}}{\text{Zellumfang}^2}$ wurden in Korrelation zu theoretisch definierten Zellformen zur Analyse der Morphologie herangezogen (Blacher et al., 2002; Rodenacker und Bengtsson, 2003; Shen, 2000). Anhand der Auswertung dieser Parameter im Streudiagramm konnte somit jeder Zelle eine distinkte krankheitsassoziierte Morphologie (physiologisch, adaptiv-hypertroph bzw. maladaptiv-hypertroph) zugeordnet werden.

Nach Optimierung der Parameter des Assays (Zelldichte pro Objektträger, Fluoreszenzintensität der transduzierten Zellen, Verhältnis Signalstärke / Hintergrundfluoreszenz, Homogenität des zellulären Fluoreszenzsignals, (vgl. Pollice et al., 2000) konnten im Rahmen der Expressionsklonierung 288 Kardiomyozytenpopulationen nach Transduktion mit rekombinanten Adenoviruspools mittels LSC morphologisch analysiert werden. Beachtet man, dass durch jeden der 288 Viruspools 12 cDNAs im korrekten Leseraster exprimiert wurden, konnten somit im Rahmen des LSC-Screenings 3.456 Proteine des humanen Herzens auf pathologische Assoziation mit der Herzinsuffizienz untersucht werden. Hierbei induzierten 8 der 288 Viruspools (also 8 der 3.456 rekombinant exprimierten cDNAs) mit statistischer Signifikanz eine pathologisch hypertrophe Morphologie der transduzierten Zellpopulation.

Die detaillierte Auswertung der Daten zeigte, dass im LSC-Screening sowohl adaptiv- als auch maladaptiv hypertrophe Morphologien infolge der rekombinanten Expression der cDNAs detektiert wurden. Um jedoch die direkte Korrelation zwischen exprimierter cDNA und induzierter Morphologie der Kardiomyozyten zu beweisen, musste eine Dekonvolution und separate LSC-Analyse aller cDNAs eines Pools durchgeführt werden. Eine derartige Analyse der 12 cDNAs des Pools #99 zeigte abschließend, dass die für das trunkierte Protein Translin kodierende cDNA eine adaptive Hypertrophie der Kardiomyozyten induzierte.

Der Einsatz des Laser Scanning Cytometers zur morphometrischen Analyse von Kardiomyozyten wurde in dieser Arbeit erstmals beschrieben. Die bisher bekannten Anwendungen des LSC dienen zumeist der Detektion intrazellulärer Fluoreszenzmarker und darauf basierenden Assays zur Immunophänotypisierung, Zellzyklusanalyse oder zur Ermittlung apoptotischer Prozesse (Darzynkiewicz und Bedner, 2000; Darzynkiewicz et al., 1999). Die Analyse der Zellmorphologie wird hierbei nur zur sekundären, optischen Kontrolle des Verfahrens eingesetzt (Bedner et al., 1999). Im Rahmen der Expressionsklonierung konnte nun das Einsatzspektrum des LSC erweitert und seine Anwendung in einem automatisierten Screeningsystem implementiert werden.

1.4. Die Expressionsklonierung im Vergleich zu etablierten Screeningverfahren zur funktionellen Analyse der Herzinsuffizienz

Die in der Literatur beschriebenen Screeningverfahren zur Detektion pathologischer Proteine der Herzinsuffizienz beruhen zumeist auf bekannten Methoden der funktionellen Genomik (z. B. DNA-Microarray-Analyse), der Proteomik (z.B. 2D-Gel Analyse) oder extrazellulär stimulierten Zellassays (Arnott et al., 1998; Cheek und Cesan, 2003; Pennica et al., 1995; Vondriska et al., 2001; Waldmuller et al., 2002). Derartige Systeme können die Quantität der Analyse einer gesamten cDNA-Bibliothek in Verbindung mit der Aussagequalität bezüglich der funktionell, im zellulären Kontext charakterisierten Targets nicht ermöglichen.

Das in dieser Arbeit entwickelte System der Expressionsklonierung stellt daher das erste zellbasierte Screeningverfahren zur direkten, funktionellen Charakterisierung von Zielproteinen der Herzinsuffizienz dar. Seine oben diskutierten Elemente wie die normalisierte cDNA-Bank, das induzierbare Vektorsystem und die automatisierte morphologische Analyse wurden im Hinblick auf eine optimale Anwendung im Assay entwickelt und validiert. Die Expressionsklonierung von 3.456 cDNAs des humanen Herzens in primären Kardiomyozyten bewies mit der Detektion von acht funktionell mit der Herzinsuffizienz assoziierten cDNA-Pools die hohe Effektivität dieses neuen Verfahrens. Vergleichbare primäre Hitraten von $\approx 0,2\%$ werden auch von in der Literatur beschriebenen zellbasierten Screeningverfahren erreicht (Michiels et al., 2002). Unter der Annahme von 30.000 Genen des Menschen kann man daher postulieren, dass durch Analyse des gesamten Genoms etwa 70 kausal in die Erkrankung involvierte Proteine detektiert werden können. Infolge der hohen Durchsatzgeschwindigkeit (Generierung rekombinanter Adenoviruspools innerhalb eines Monats, Kultivierung transduzierter Kardiomyozyten für 60 h, LSC-Screening einer Zellpopulation pro Stunde) sollte auch die Expressionsklonierung einer vollständigen Genbank technisch durchführbar sein.

Durch Abwandlung des modularen Aufbaus kann das System zudem für weitere biologische, medizinische oder pharmakologische Fragestellungen genutzt werden. Mögliche Varianten sind:

- Screening weiterer Genbanken, Antisense-, RNAi-Bibliotheken oder pharmakologisch wirksamer Moleküle
- Analyse der heterologen Moleküle in anderen Zellkultursystemen
- LSC basierte Analyse spezifischer, intrazellulärer Parameter (beispielsweise Fluoreszenzmarkierung von Proteinen zur Bestimmung der Lokalisation oder Kinetik, Fluoreszenzmarkierung von Nukleinsäuren zur genetischen Analyse)

Der Einsatz des morphologischen Analyseverfahrens konnte bereits zur erfolgreichen Validierung und Patentierung krankheitsassoziierter Targets der Herzinsuffizienz eingesetzt werden. Das Schema der Entwicklung und Anwendung des diskutierten Expressionsklonierungssystems wird abschließend in der Abbildung 65 dargestellt.

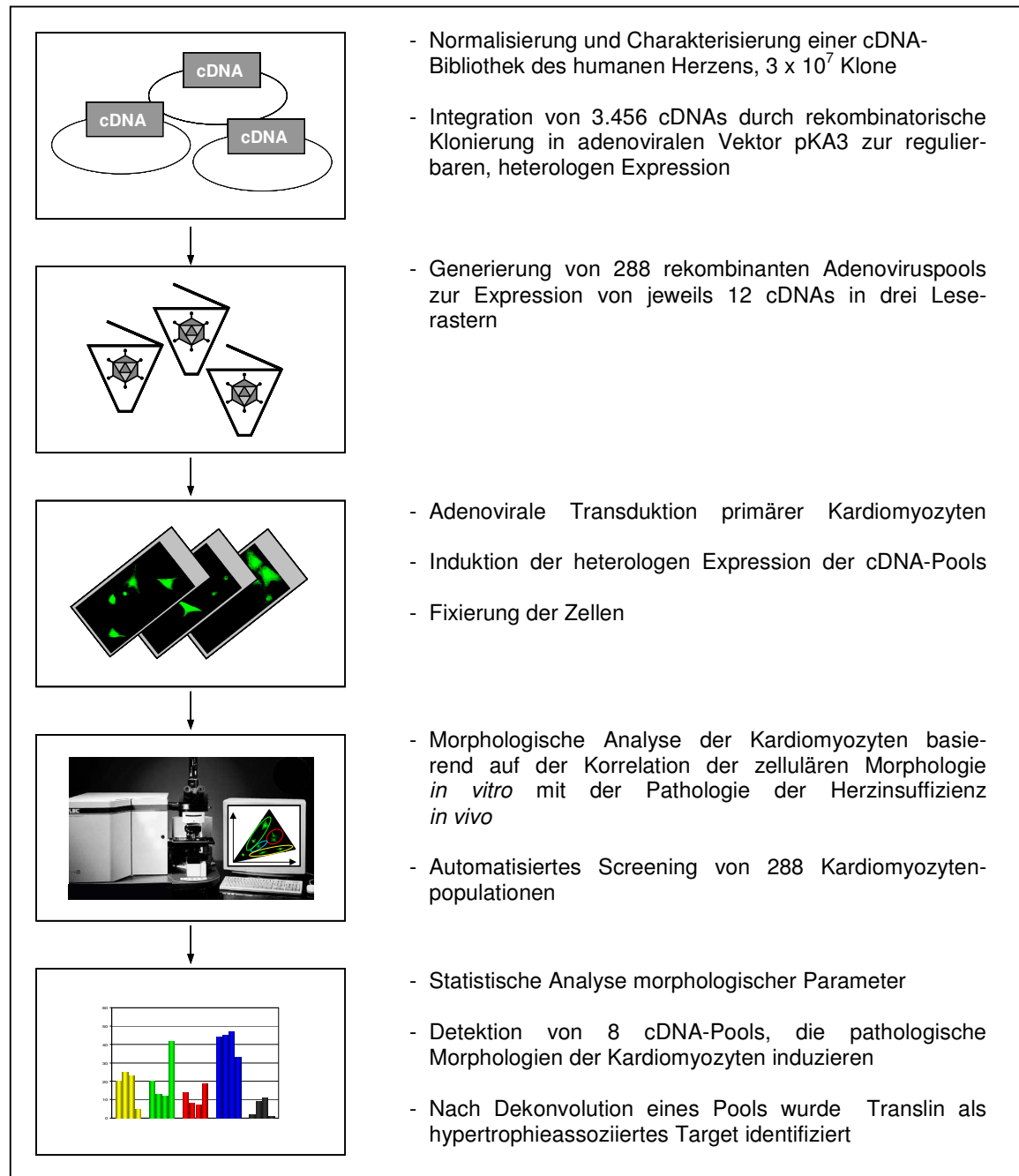


Abbildung 65: Schema der Expressionsklonierung

Zur Detektion kausaler Targets der Herzinsuffizienz wurde ein Expressionsklonierungssystem in primären Kardiomyozyten generiert. Nach funktioneller Analyse von humanen cDNAs wurde Translin als neues, mit der Pathogenese assoziiertes Protein validiert.

2. Charakterisierung eines potenziellen Targets aus der Expressionsklonierung: Translin

2.1. Zellbiologische Funktion von Translin

Im Rahmen der Expressionsklonierung führte die Überexpression der cDNAs des Pools #99 in primären Kardiomyozyten zur Ausbildung der adaptiven Hypertrophie, gekennzeichnet durch eine signifikante Vergrößerung der Zellfläche. Die separate Überexpression der cDNAs des Pools zeigte, dass das N-terminal trunkeierte Protein Translin (Δ -Translin) diesen pathologischen Effekt induzierte. Die heterologe Expression des Wildtypproteins (WT-Translin) verursachte hingegen in Kardiomyozyten eine signifikante Elongation der Zellform, die mit der maladaptiven Hypertrophie assoziiert war. Während WT-Translin zwei funktionelle Domänen zur DNA / RNA-Bindung, eine GTP-Bindedomäne sowie ein Leucin-Zipper-Motiv zur Dimerisierung aufweist, ist Δ -Translin in den Nukleinsäurebindedomänen deletiert (Chennathukuzhi et al., 2001), (vgl. Abb. 59).

Translin bzw. Testis brain RNA binding protein (TB-RBP, das homologe Protein der Maus) ist ein Einzelstrang-DNA- und RNA-bindendes Protein (Wu et al., 1998). Seit seiner erstmaligen Beschreibung 1991 werden Translin sowohl nukleäre Funktionen bei chromosomaler Translokation und DNA-Reparatur als auch zytoplasmatische Aufgaben des RNA-Transports und der Regulation der Translation zugewiesen (Han et al., 1995; Kasai et al., 1997; Kwon und Hecht, 1991). Das Protein wird besonders im Testis und Gehirn stark exprimiert, es kann jedoch auch in Organen wie Lunge und Niere nachgewiesen werden (Finkenstadt et al., 2001). Bisher wurde Translin *in vitro* in Keimzellen und Zelllinien, wie beispielsweise 3T3-Fibroblasten, charakterisiert (Chennathukuzhi et al., 2001; Wu und Hecht, 2000). Die Funktion von Translin in Kardiomyozyten wurde bislang jedoch nicht aufgeklärt. Die kausale Assoziation von Translin mit der Pathogenese der Herzinsuffizienz wurde somit erstmalig in dieser Arbeit erkannt.

Die zytoplasmatische Lokalisation sowie die Korrelation zwischen Nukleinsäurebindedomänen und Morphologie primärer Kardiomyozyten lassen eine funktionelle Beteiligung von Translin an RNA-spezifischen Prozessen vermuten.

Zellbiologische Forschungen haben ergeben, dass die zytosolische Lokalisation der mRNA-Transkripte größtenteils nicht durch freie Diffusion, sondern durch definierte Interaktionen mit dem Zytoskelett bedingt ist (Jansen, 1999; Lipshitz und Smibert, 2000; Wu und Hecht, 2000). Der gerichtete Transport, die spezifische Lokalisation sowie die Kontrolle der Degradation und Translation der mit dem Zytoskelett assoziierten Transkripte wurde in zahlreichen Zellmodellen bewiesen (Jockusch et al., 2003). Während der Regulation der posttranskriptionalen Prozesse bis zur Translation sind die mRNAs unter anderem mit RNA-bindenden Proteinen und Ribonukleoproteinen (hn RNP) in so genannten Lokasomen (oder ribonukleären Komplexen, RNP) organisiert (Dreyfuss et al., 2002; Farina und Singer, 2002). Eine enge Assoziation mit Motorproteinen und Proteinen des Translationsapparates ermöglicht die kontrollierte Lokalisation und Proteinsynthese (Jansen, 1999).

Die Interaktion der RNA mit Mikrotubuli oder Mikrofilamenten wird dabei von Ankerproteinen übernommen. Bekannte Proteine wie Spnr (Maus), Staufen (*Drosophila*) oder Vg1 (*Xenopus*) interagieren hierbei spezifisch sowohl mit Elementen des Zytoskeletts als auch mit definierten Bereichen der 3'-untranslatierten Nukleinsäuresequenz (3'-UTR) der mRNA (Bycroft et al., 1995; Elisha et al., 1995; Schumacher et al., 1995).

Literaturdaten zufolge dient auch Translin als Adapterprotein, um RNAs mit Mikrotubuli oder Actinfilamenten zu verknüpfen (Wu und Hecht, 2000; Wu et al., 1999). Es gilt als erwiesen, dass Translin hierbei die Translation seiner gebundenen mRNAs supprimiert (Han et al., 1995). Die gewebe- und funktionsspezifischen Interaktionspartner von Translin sind bislang nur unvollständig aufgeklärt (Wu et al., 1999). Es konnten jedoch zwei notwendige Sequenzbereiche der 3'-UTR zur Bindung von mRNAs mit Translin definiert werden.

Durch Datenbankanalyse und Bindungsassays wurde gezeigt, dass unter anderem folgende mRNAs diese spezifischen 3'-UTRs aufweisen und mit Translin interagieren können (Han et al., 1995; Wu und Hecht, 2000):

- MAP-Kinasen
- cAMP-Kinase
- Cadherin
- Calcium-aktivierter Kalium-Kanal
- Hitzeschockprotein 27
- γ -Actin
- Calmodulin-abhängige Kinase II (CamK II)

Aus der Literatur ist bekannt, dass eine pathologische Expression dieser Gene in Kardiomyozyten mit der Herzinsuffizienz assoziiert ist (Katz, 2001; Kirchhefer et al., 1999; Maier und Bers, 2002; Netticadan et al., 2000; Nicol et al., 2000; Wang und Gerdes, 1999). Translin kann somit funktionell sowohl an physiologischen wie auch pathologischen Prozessen der RNA-Regulation in Herzmuskelzellen beteiligt sein.

2.2. Pathologische Bedeutung von Translin in der Herzinsuffizienz

Die kardiovaskuläre Pathogenese ist durch eine Veränderung der Genexpression gekennzeichnet, die unter anderem durch posttranskriptionale Prozesse reguliert wird (Misquitta et al., 2001). Die Expression zahlreicher krankheitsassoziierter Proteine wie β -adrenerge Rezeptoren, Angiotensin II Rezeptor oder Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA) wird hierbei auf RNA-Ebene kontrolliert (Dangel et al., 1996; Misquitta et al., 2001; Misquitta et al., 2002). Die Erkenntnisse bezüglich der regulierenden Faktoren, wie beispielsweise RNA-bindender Proteine, sind allerdings nur unvollständig. Erste Untersuchungen konnten jedoch zeigen, dass pathologische Stimuli wie Aktivierung der adrenergen Signaltransduktion, Hypoxie oder Bluthochdruck die Expression derartiger RNA-bindender Proteine beeinflusst (Blaxall et al., 2000; Misquitta et al., 2001).

Auch das in dieser Arbeit detektierte Translin zählt zu den RNA-bindenden Proteinen. In Untersuchungen humaner Herzgewebeproben wurde eine signifikant erhöhte Expressionsrate im insuffizienten Herzen detektiert und somit die Korrelation der *in vitro* Funktionsanalyse mit der *in vivo* Erkrankung bewiesen. Basierend auf Literaturdaten und Ergebnissen der vorliegenden Arbeit lässt sich folgende Hypothese zur pathologischen Funktion von Translin aufstellen:

Durch erhöhte Expression von Translin werden im insuffizienten humanen Herzen spezifische mRNAs, die für Proteine der Signaltransduktion, Calcium-Homöostase oder Zellarchitektur kodieren, in ihrer physiologischen Lokalisation und Translation gestört. Das pathologische Expressionsprofil verursacht die Progression der Erkrankung unter Ausbildung der maladaptiven Hypertrophie, die schließlich zu Dekompensation des Herzens führen kann.

Die Reduktion funktionell aktiver Translinmoleküle stellt daher eine Möglichkeit dar, die Ausbildung der maladaptiven Hypertrophie zu unterdrücken, wie bereits in ersten Untersuchungen mit der artifiziellen dominant negativen Mutante von Translin gezeigt werden konnte. So wurde durch potentielle Inhibition der RNA-Retardierung von Translin in

primären Kardiomyozyten die Ausbildung der adaptiven Hypertrophie induziert, welche die kompensatorische Phase der Herzinsuffizienz reflektiert.

Auf Grund der Induktion einer maladaptiven Morphologie *in vitro*, deren Ausbildung *in vivo* mit der Umstrukturierung des Herzens und resultierender drastischer Verschlechterung hämodynamischer Parameter korreliert, stellt Translin ein wichtiges „Schalterprotein“ (Switch) der Herzinsuffizienz dar. Eine therapeutische Regulation des Targets Translin könnte daher den bislang nicht effizient blockierbaren oder revertierbaren Prozess der Remodellierung attenuieren.

2.3. Translin als therapeutisches Target der Herzinsuffizienz

In der „postgenomischen Ära“ der Biotechnologie wurden bislang die Hälfte der von 30.000 humanen Genen kodierten Proteine funktionell klassifiziert und etwa 3.000 krankheitsassoziierte Gene detektiert (Claverie, 2001; Hopkins und Groom, 2002). Die zurzeit eingesetzten Medikamente basieren jedoch auf pharmakologischen Interaktionen mit nur ca. 500 Biomolekülen aus sieben Hauptklassen wie G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, Proteinkinasen oder nukleären Rezeptoren (Drews, 2000). Durch den Einsatz neuer Hochdurchsatz-Screeningverfahren (HTS) erwartet man, in der Zukunft bis zu 3.000 therapeutisch beeinflussbare Zielmoleküle zu validieren (Hopkins und Groom, 2002).

Das pharmakologische Potenzial der RNA-modifizierenden Proteine wurde hierbei noch nicht genutzt. Besonders im Hinblick auf den bislang nicht gedeckten Bedarf an Medikamenten zur kausalen Behandlung der Herzinsuffizienz stellt das Konzept der pathologischen RNA-Regulation einen neuen Ansatz der Targetvalidierung dar.

In dieser Arbeit konnte Translin im primären zellulären Assay erstmals als potenzielles Target dieser Molekülklasse validiert werden. Die Funktion von Translin muss durch nachfolgende Untersuchungen (Bestimmung der Interaktionspartner, biochemische Parameter, *in vivo* Validierung) weiter charakterisiert werden. Neben der kausalen Assoziation mit der Herzinsuffizienz muss jedoch auch die pharmakologische Therapierbarkeit des Targets Translin gegeben sein. Ein Screening nach therapeutischen Molekülen, welche die pathologische RNA-Bindung von Translin inhibieren, wird wegen der bereits bekannten, funktionellen Domänen und Röntgenstrukturanalyse von Translin erleichtert (Pascal et al., 2001; VanLoock et al., 2001).

Als besonders attraktiv erscheint hierbei die Blockierung der GTP-Bindungsdomäne, die zum Verlust der RNA-Bindfähigkeit von Translin führt (Chennathukuzhi et al., 2001). Die Modulation derartiger Domänen ist seit langem pharmakologisch etabliert und erleichtert somit eine effiziente Entwicklung therapeutischer Moleküle (George et al., 2002). Weitere Möglichkeiten zur Inhibierung der RNA-Bindung bestehen in direkter Interaktion von

synthetischen DNA- oder RNA-Molekülen mit den basischen Nukleinsäurebindedomänen von Translin oder der Blockierung des Leucin-Zipper-Motivs, wodurch eine funktionell notwendige Dimerisierung des Proteins verhindert wird (Wu et al., 1998). Die Struktur und Funktion von Translin sowie seine potenziell pathologische Assoziation mit der Herzinsuffizienz werden anschließend in den Abbildungen 66 und 67 aufgeführt.

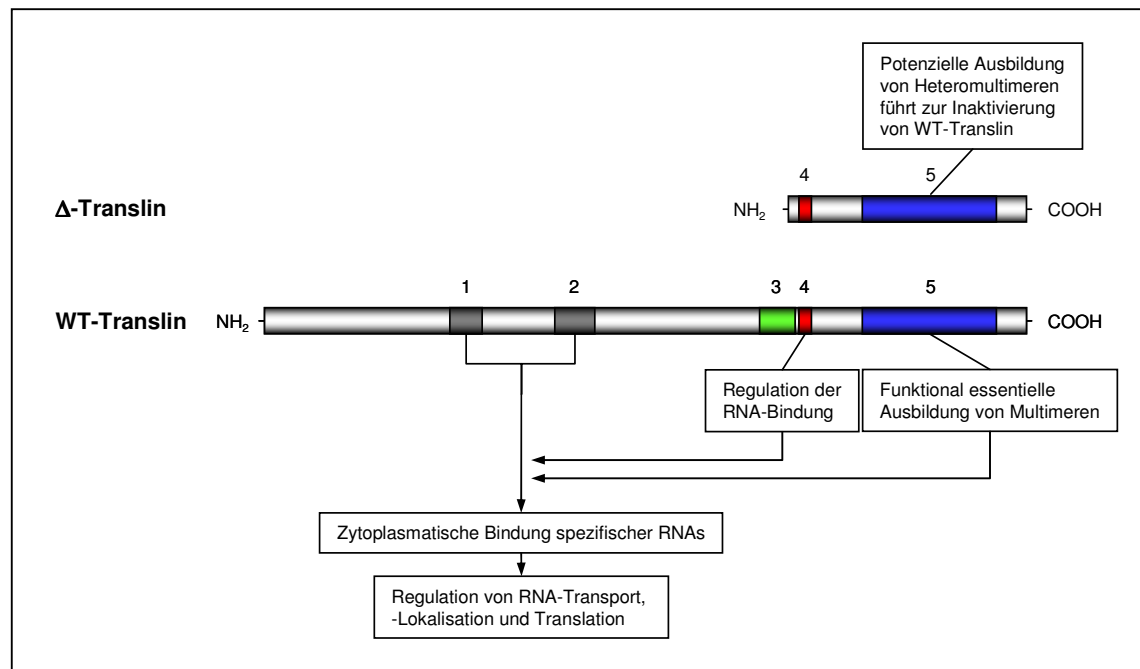


Abbildung 66: Struktur und potenzielle Funktion des Targets Translin sowie seiner Deletionsmutante Δ -Translin

Das Target Translin ist ein nukleinsäurebindendes Protein. Struktur und Funktionsanalysen zeigen, dass es an der posttranskriptionalen Regulation spezifischer RNA-Moleküle beteiligt ist. Die in der Expressionsklonierung detektierte N-terminal trunke Mutante Δ -Translin induziert *in vitro* eine adaptive Hypertrophie primärer Kardiomyozyten. Literaturdaten lassen vermuten, dass Δ -Translin keine Nukleinsäuren bindet und mit dem Wildtyp WT-Translin Heteromultimere ausbildet, die funktionell inhibiert sind.

- 1, 2: Basische Domänen zur Nukleinsäurebindung
- 3: Nukleäres Exportsignal
- 4: GTP-Bindungsdomäne
- 5: Leucin-Zipper-Motiv zur Dimerisierung

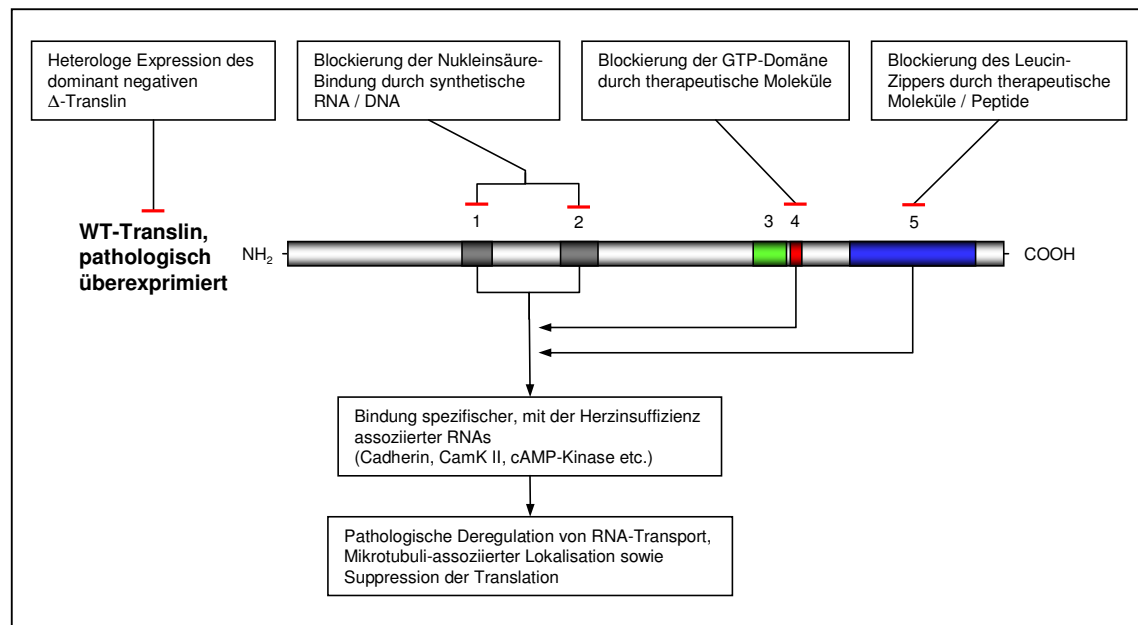


Abbildung 67: Potenzielle pathologische Funktion des Targets Translin in der Herzinsuffizienz

Translin ist in der humanen Erkrankung überexprimiert. Auf Grund von Literaturdaten kann postuliert werden, dass es unter anderem mit der Herzinsuffizienz assoziierte RNAs bindet und deren Translation supprimiert. Eine resultierende Deregulation der Genexpression ist ein wesentlicher Modulator der Pathogenese. Die mögliche Inhibierung RNA-Bindung durch Blockierung spezifischer Proteindomänen bietet Ansatzpunkte zur Entwicklung neuer Therapeutika.

- 1,2: Basische Domänen zur Nukleinsäurebindung
 - 3: Nukleäres Exportsignal
 - 4: GTP-Bindungsdomäne
 - 5: Leuzin-Zipper-Motiv zur Dimerisierung
- CamK: Calmodulin Kinase

Die *in vitro* Ergebnisse dieser Arbeit belegen erstmalig, dass Translin ein wichtiges regulatorisches Protein der Pathogenese der Herzinsuffizienz darstellt. Seine Funktion der RNA-Regulation bietet einen neuartigen Ansatzpunkt zur Entwicklung innovativer Medikamente, welche die maladaptive Progression der Erkrankung beeinflussen können. Weiterführende biologische und pharmakologische Untersuchungen werden zeigen, welches Potenzial Translin bei der kausalen Behandlung der humanen Herzinsuffizienz beigemessen werden kann.

Translin als therapeutisches kardiologisches Target wurde zum Patent angemeldet (vorläufige Patentnummer MG-KA / 03-04).

F. Literaturverzeichnis

- Agha-Mohammadi, S., and Lotze, M. T. (2000). Regulatable systems: applications in gene therapy and replicating viruses. *J Clin Invest* 105, 1177-1183.
- Anand, I. S., Liu, D., Chugh, S. S., Prahash, A. J., Gupta, S., John, R., Popescu, F., and Chandrashekhar, Y. (1997). Isolated myocyte contractile function is normal in postinfarct remodeled rat heart with systolic dysfunction. *Circulation* 96, 3974-3984.
- Ansuini, H., Cicchini, C., Nicosia, A., Tripodi, M., Cortese, R., and Luzzago, A. (2002). Biotin-tagged cDNA expression libraries displayed on lambda phage: a new tool for the selection of natural protein ligands. *Nucleic Acids Res* 30, e78.
- Aoki, K., Suzuki, K., Sugano, T., Tasaka, T., Nakahara, K., Kuge, O., Omori, A., and Kasai, M. (1995). A novel gene, Translin, encodes a recombination hotspot binding protein associated with chromosomal translocations. *Nat Genet* 10, 167-174.
- Arnott, D., O'Connell, K. L., King, K. L., and Stults, J. T. (1998). An integrated approach to proteome analysis: identification of proteins associated with cardiac hypertrophy. *Anal Biochem* 258, 1-18.
- Auerbach, D., Thaminy, S., Hottiger, M. O., and Stajlar, I. (2002). The post-genomic era of interactive proteomics: facts and perspectives. *Proteomics* 2, 611-623.
- Baker, D. W. (2002). Prevention of heart failure. *J Card Fail* 8, 333-346.
- Bals, R., and Jany, B. (2001). Identification of disease genes by expression profiling. *Eur Respir J* 18, 882-889.
- Bedner, E., Li, X., Gorczyca, W., Melamed, M. R., and Darzynkiewicz, Z. (1999). Analysis of apoptosis by laser scanning cytometry. *Cytometry* 35, 181-195.
- Bett, A. J., Krougliak, V., and Graham, F. L. (1995). DNA sequence of the deletion/insertion in early region 3 of Ad5 dl309. *Virus Res* 39, 75-82.
- Blacher, S., Maquet, V., Jerome, R., and Pirard, J. (2002). Image analysis characterization of highly orientated freeze-drying porous materials. *Image Anal Stereol*, 43-48.
- Blaxall, B. C., Pellett, A. C., Wu, S. C., Pende, A., and Port, J. D. (2000). Purification and characterization of beta-adrenergic receptor mRNA-binding proteins. *J Biol Chem* 275, 4290-4297.
- Bleicher, K. H., Bohm, H. J., Muller, K., and Alanine, A. I. (2003). Hit and lead generation: beyond high-throughput screening. *Nat Rev Drug Discov* 2, 369-378.
- Bocker, W., Gantenberg, H. W., Muller, W. U., and Streffer, C. (1996). Automated cell cycle analysis with fluorescence microscopy and image analysis. *Phys Med Biol* 41, 523-537.
- Braun, P., Hu, Y., Shen, B., Halleck, A., Koundinya, M., Harlow, E., and LaBaer, J. (2002). Proteome-scale purification of human proteins from bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2654-2659.
- Brogden, R. N., Goa, K. L., and Faulds, D. (1993). Mifepristone. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential. *Drugs* 45, 384-409.
- Burcin, M. M., BW, O. M., and Tsai, S. Y. (1998). A regulatory system for target gene expression. *Front Biosci* 3, c1-7.

- Burcin, M. M., Schiedner, G., Kochanek, S., Tsai, S. Y., and O'Malley, B. W. (1999). Adenovirus-mediated regulable target gene expression in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 355-360.
- Bussow, K., Nordhoff, E., Lubbert, C., Lehrach, H., and Walter, G. (2000). A human cDNA library for high-throughput protein expression screening. *Genomics* *65*, 1-8.
- Bycroft, M., Grunert, S., Murzin, A. G., Proctor, M., and St Johnston, D. (1995). NMR solution structure of a dsRNA binding domain from *Drosophila* staufer protein reveals homology to the N-terminal domain of ribosomal protein S5. *Embo J* *14*, 3563-3571.
- Carabello, B. A. (2002). Concentric versus eccentric remodeling. *J Card Fail* *8*, S258-263.
- Carninci, P., Shibata, Y., Hayatsu, N., Sugahara, Y., Shibata, K., Itoh, M., Konno, H., Okazaki, Y., Muramatsu, M., and Hayashizaki, Y. (2000). Normalization and subtraction of cap-trapper-selected cDNAs to prepare full-length cDNA libraries for rapid discovery of new genes. *Genome Res* *10*, 1617-1630.
- Chanda, S. K., and Caldwell, J. S. (2003). Fulfilling the promise: drug discovery in the post-genomic era. *Drug Discov Today* *8*, 168-174.
- Chartier, C., Degryse, E., Gantzer, M., Dieterle, A., Pavirani, A., and Mehtali, M. (1996). Efficient generation of recombinant adenovirus vectors by homologous recombination in *Escherichia coli*. *J Virol* *70*, 4805-4810.
- Cheek, D. J., and Cesan, A. (2003). Genetic predictors of cardiovascular disease: the use of chip technology. *J Cardiovasc Nurs* *18*, 50-56.
- Chennathukuzhi, V. M., Kurihara, Y., Bray, J. D., Yang, J., and Hecht, N. B. (2001). Altering the GTP binding site of the DNA/RNA-binding protein, Translin/TB-RBP, decreases RNA binding and may create a dominant negative phenotype. *Nucleic Acids Res* *29*, 4433-4440.
- Chien, K. R. (1999). Stress pathways and heart failure. *Cell* *98*, 555-558.
- Chien, K. R. (2000). Genomic circuits and the integrative biology of cardiac diseases. *Nature* *407*, 227-232.
- Chien, K. R. (2003). Genotype, phenotype: upstairs, downstairs in the family of cardiomyopathies. *J Clin Invest* *111*, 175-178.
- Cho, C. H., and Nuttall, M. E. (2002). Emerging techniques for the discovery and validation of therapeutic targets for skeletal diseases. *Expert Opin Ther Targets* *6*, 679-689.
- CIBIS-Investigators, and Committees (1999). The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS-II): a randomised trial. *Lancet* *353*, 9-13.
- Claverie, J. M. (2001). Gene number. What if there are only 30,000 human genes? *Science* *291*, 1255-1257.
- Claytor, R. B., Li, J. M., Furman, M. I., Garnette, C. S., Rohrer, M. J., Barnard, M. R., Krueger, L. A., Frelinger, A. L., 3rd, and Michelson, A. D. (2001). Laser scanning cytometry: a novel method for the detection of platelet-endothelial cell adhesion. *Cytometry* *43*, 308-313.
- Cohn, J. N. (1995). Structural basis for heart failure. Ventricular remodeling and its pharmacological inhibition. *Circulation* *91*, 2504-2507.

- Cohn, J. N. (2002). Global structural ventricular remodeling: summation. *J Card Fail* 8, S269-270.
- Dangel, V., Giray, J., Ratge, D., and Wisser, H. (1996). Regulation of beta-adrenoceptor density and mRNA levels in the rat heart cell-line H9c2. *Biochem J* 317 (Pt 3), 925-931.
- Danthinne, X., and Imperiale, M. J. (2000). Production of first generation adenovirus vectors: a review. *Gene Ther* 7, 1707-1714.
- Darzynkiewicz, Z., and Bedner, E. (2000). Analysis of apoptotic cells by flow and laser scanning cytometry. *Methods Enzymol* 322, 18-39.
- Darzynkiewicz, Z., Bedner, E., Li, X., Gorczyca, W., and Melamed, M. R. (1999). Laser-scanning cytometry: A new instrumentation with many applications. *Exp Cell Res* 249, 1-12.
- Davidov, E., Holland, J., Marple, E., and Naylor, S. (2003). Advancing drug discovery through systems biology. *Drug Discov Today* 8, 175-183.
- De Backer, M. D., Nelissen, B., Logghe, M., Viaene, J., Loonen, I., Vandoninck, S., de Hoogt, R., Dewaele, S., Simons, F. A., Verhasselt, P., *et al.* (2001). An antisense-based functional genomics approach for identification of genes critical for growth of *Candida albicans*. *Nat Biotechnol* 19, 235-241.
- Diatchenko, L., Lau, Y. F., Campbell, A. P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E. D., and Siebert, P. D. (1996). Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6025-6030.
- Drews, J. (2000). Drug discovery: a historical perspective. *Science* 287, 1960-1964.
- Dreyfuss, G., Kim, V. N., and Kataoka, N. (2002). Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 195-205.
- Dunn, M. J. (2000). Studying heart disease using the proteomic approach. *Drug Discov Today* 5, 76-84.
- Edholm, D., Molin, M., Bajak, E., and Akusjarvi, G. (2001). Adenovirus vector designed for expression of toxic proteins. *J Virol* 75, 9579-9584.
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498.
- Elisha, Z., Havin, L., Ringel, I., and Yisraeli, J. K. (1995). Vg1 RNA binding protein mediates the association of Vg1 RNA with microtubules in *Xenopus* oocytes. *Embo J* 14, 5109-5114.
- Elliott, J. T., Tona, A., and Plant, A. L. (2003). Comparison of reagents for shape analysis of fixed cells by automated fluorescence microscopy. *Cytometry* 52A, 90-100.
- Emery, D. W., Yannaki, E., Tubb, J., and Stamatoyannopoulos, G. (2000). A chromatin insulator protects retrovirus vectors from chromosomal position effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 9150-9155.
- Farina, K. L., and Singer, R. H. (2002). The nuclear connection in RNA transport and localization. *Trends Cell Biol* 12, 466-472.

- Finkenstadt, P. M., Jeon, M., and Baraban, J. M. (2001). Masking of the Translin/Trax complex by endogenous RNA. *FEBS Lett* 498, 6-10.
- Force, T., Michael, A., Kilter, H., and Haq, S. (2002). Stretch-activated pathways and left ventricular remodeling. *J Card Fail* 8, S351-358.
- Francis, G. S., Goldsmith, S. R., Levine, T. B., Olivari, M. T., and Cohn, J. N. (1984). The neurohumoral axis in congestive heart failure. *Ann Intern Med* 101, 370-377.
- Fu, X. D., Mayeda, A., Maniatis, T., and Krainer, A. R. (1992). General splicing factors SF2 and SC35 have equivalent activities in vitro, and both affect alternative 5' and 3' splice site selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 11224-11228.
- Fujii, T., Yamaoka, H., Gomi, K., Kitamoto, K., and Kumagai, C. (1995). Cloning and nucleotide sequence of the ribonuclease T1 gene (*rntA*) from *Aspergillus oryzae* and its expression in *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae*. *Biosci Biotechnol Biochem* 59, 1869-1874.
- Fuster, V., Alexander, R. W., and O'Rourke, R. A., eds. (2001). Hurst's THE HEART (10th edition) (USA, McGraw-Hill).
- Gaballa, M. A., and Goldman, S. (2002). Ventricular remodeling in heart failure. *J Card Fail* 8, S476-485.
- Gao, G. P., Yang, Y., and Wilson, J. M. (1996). Biology of adenovirus vectors with E1 and E4 deletions for liver-directed gene therapy. *J Virol* 70, 8934-8943.
- Garrington, T. P., and Johnson, G. L. (1999). Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* 11, 211-218.
- George, S. R., O'Dowd, B. F., and Lee, S. P. (2002). G-protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 1, 808-820.
- Gerdes, A. M. (2002). Cardiac myocyte remodeling in hypertrophy and progression to failure. *J Card Fail* 8, S264-268.
- Greber, U. F. (2002). Signalling in viral entry. *Cell Mol Life Sci* 59, 608-626.
- Grossman, W., Jones, D., and McLaurin, L. P. (1975). Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest* 56, 56-64.
- Grunig, E., Tasman, J. A., Kucherer, H., Franz, W., Kubler, W., and Katus, H. A. (1998). Frequency and phenotypes of familial dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 31, 186-194.
- Gudi, S. R., Lee, A. A., Clark, C. B., and Frangos, J. A. (1998). Equibiaxial strain and strain rate stimulate early activation of G proteins in cardiac fibroblasts. *Am J Physiol* 274, C1424-1428.
- Gustafson, T. A., Markham, B. E., Bahl, J. J., and Morkin, E. (1987). Thyroid hormone regulates expression of a transfected alpha-myosin heavy-chain fusion gene in fetal heart cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 3122-3126.
- Han, J. R., Yiu, G. K., and Hecht, N. B. (1995). Testis/brain RNA-binding protein attaches translationally repressed and transported mRNAs to microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9550-9554.
- Harris, P. (1983). Evolution and the cardiac patient. *Cardiovasc Res* 17, 437-445.

- Hartley, J. L., Temple, G. F., and Brasch, M. A. (2000). DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Res* 10, 1788-1795.
- Harvey, D. M., and Caskey, C. T. (1998). Inducible control of gene expression: prospects for gene therapy. *Curr Opin Chem Biol* 2, 512-518.
- Hauptschein, R. S., Eustace, B. K., and Jay, D. G. (2002). Global high-throughput screens for cellular function. *Exp Hematol* 30, 381-387.
- He, T. C., Zhou, S., da Costa, L. T., Yu, J., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1998). A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2509-2514.
- Hefti, M. A., Harder, B. A., Eppenberger, H. M., and Schaub, M. C. (1997). Signaling pathways in cardiac myocyte hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 29, 2873-2892.
- Hein, S., Arnon, E., Kostin, S., Schonburg, M., Elsasser, A., Polyakova, V., Bauer, E. P., Klovekorn, W. P., and Schaper, J. (2003). Progression from compensated hypertrophy to failure in the pressure-overloaded human heart: structural deterioration and compensatory mechanisms. *Circulation* 107, 984-991.
- Hildebrand, H. (1998). *Psyhyrembel Klinisches Wörterbuch*, 258. Auflage (Berlin, Walter de Gruyter & Co.).
- Hopkins, A. L., and Groom, C. R. (2002). The druggable genome. *Nat Rev Drug Discov* 1, 727-730.
- Hoshijima, M., and Chien, K. R. (2002). Mixed signals in heart failure: cancer rules. *J Clin Invest* 109, 849-855.
- Hu, H., and Sachs, F. (1997). Stretch-activated ion channels in the heart. *J Mol Cell Cardiol* 29, 1511-1523.
- Hunt, S. A., Baker, D. W., Chin, M. H., Cinquegrani, M. P., Feldmanmd, A. M., Francis, G. S., Ganiats, T. G., Goldstein, S., Gregoratos, G., Jessup, M. L., *et al.* (2001). ACC/AHA Guidelines for the Evaluation and Management of Chronic Heart Failure in the Adult: Executive Summary A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee to Revise the 1995 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure): Developed in Collaboration With the International Society for Heart and Lung Transplantation; Endorsed by the Heart Failure Society of America. *Circulation* 104, 2996-3007.
- Hunter, J. J., and Chien, K. R. (1999). Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *N Engl J Med* 341, 1276-1283.
- Hwang, J. J., Allen, P. D., Tseng, G. C., Lam, C. W., Fananapazir, L., Dzau, V. J., and Liew, C. C. (2002). Microarray gene expression profiles in dilated and hypertrophic cardiomyopathic end-stage heart failure. *Physiol Genomics* 10, 31-44.
- Hwang, J. J., Dzau, V. J., and Liew, C. C. (2001). Genomics and the pathophysiology of heart failure. *Curr Cardiol Rep* 3, 198-207.
- James, M. A., Saadeh, A. M., and Jones, J. V. (2000). Wall stress and hypertension. *J Cardiovasc Risk* 7, 187-190.
- Jansen, R. P. (1999). RNA-cytoskeletal associations. *Faseb J* 13, 455-466.

- Jockusch, B. M., Huttelmaier, S., and Illenberger, S. (2003). From the nucleus toward the cell periphery: a guided tour for mRNAs. *News Physiol Sci* 18, 7-11.
- Kamentsky, L. A., Burger, D. E., Gershman, R. J., Kamentsky, L. D., and Luther, E. (1997). Slide-based laser scanning cytometry. *Acta Cytol* 41, 123-143.
- Karmazyn, M., Gan, X. T., Humphreys, R. A., Yoshida, H., and Kusumoto, K. (1999). The myocardial Na(+)-H(+) exchange: structure, regulation, and its role in heart disease. *Circ Res* 85, 777-786.
- Kasai, M., Matsuzaki, T., Katayanagi, K., Omori, A., Maziarz, R. T., Strominger, J. L., Aoki, K., and Suzuki, K. (1997). The translin ring specifically recognizes DNA ends at recombination hot spots in the human genome. *J Biol Chem* 272, 11402-11407.
- Kass-Eisler, A., Falck-Pedersen, E., Alvira, M., Rivera, J., Buttrick, P. M., Wittenberg, B. A., Cipriani, L., and Leinwand, L. A. (1993). Quantitative determination of adenovirus-mediated gene delivery to rat cardiac myocytes in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 11498-11502.
- Katsuragi, T., and Tani, Y. (2001). Single-Cell Sorting of Microorganisms by Flow or Slide-Based Cytometry. *Acta Biotechnol*, 99-115.
- Katz, A. M. (1998). Evolving concepts of heart failure: cooling furnace, malfunctioning pump, enlarging muscle. Part II: Hypertrophy and dilatation of the failing heart. *J Card Fail* 4, 67-81.
- Katz, A. M. (2000). Heart failure: pathophysiology, molecular biology, and clinical management (Philadelphia, PA, Lippincott/Williams & Wilkins).
- Katz, A. M. (2001). Physiology of the heart, 3rd edn (Philadelphia, PA USA, Lippincott, Williams & Wilkins).
- Katz, A. M. (2003). Pathophysiology of heart failure: identifying targets for pharmacotherapy. *Med Clin North Am* 87, 303-316.
- Ketner, G., Spencer, F., Tugendreich, S., Connelly, C., and Hieter, P. (1994). Efficient manipulation of the human adenovirus genome as an infectious yeast artificial chromosome clone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 6186-6190.
- Keyes, W. M., and Mills, A. A. (2003). Inducible systems see the light. *Trends Biotechnol* 21, 53-55.
- King, K. L., Winer, J., Phillips, D. M., Quach, J., Williams, P. M., and Mather, J. P. (1998). Phenylephrine, endothelin, prostaglandin F₂α and leukemia inhibitory factor induce different cardiac hypertrophy phenotypes in vitro. *Endocrine* 9, 45-55.
- Kirchhefer, U., Schmitz, W., Scholz, H., and Neumann, J. (1999). Activity of cAMP-dependent protein kinase and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human hearts. *Cardiovasc Res* 42, 254-261.
- Koh, E. Y., Chen, T., and Daley, G. Q. (2002). Novel retroviral vectors to facilitate expression screens in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 30, e142.
- Kohchi, T., Fujishige, K., and Ohyama, K. (1995). Construction of an equalized cDNA library from *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 8, 771-776.

- Kudoh, T., Tsang, M., Hukriede, N. A., Chen, X., Dedekian, M., Clarke, C. J., Kiang, A., Schultz, S., Epstein, J. A., Toyama, R., and Dawid, I. B. (2001). A gene expression screen in zebrafish embryogenesis. *Genome Res* 11, 1979-1987.
- Kunisada, K., Tone, E., Fujio, Y., Matsui, H., Yamauchi-Takahara, K., and Kishimoto, T. (1998). Activation of gp130 transduces hypertrophic signals via STAT3 in cardiac myocytes. *Circulation* 98, 346-352.
- Kwon, Y. K., and Hecht, N. B. (1991). Cytoplasmic protein binding to highly conserved sequences in the 3' untranslated region of mouse protamine 2 mRNA, a translationally regulated transcript of male germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 3584-3588.
- Lam, P. Y., and Breakefield, X. O. (2000). Hybrid vector designs to control the delivery, fate and expression of transgenes. *J Gene Med* 2, 395-408.
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., *et al.* (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860-921.
- Lechat, P., Packer, M., Chalon, S., Cucherat, M., Arab, T., and Boissel, J. P. (1998). Clinical effects of beta-adrenergic blockade in chronic heart failure: a meta-analysis of double-blind, placebo-controlled, randomized trials. *Circulation* 98, 1184-1191.
- Li, E., Stupack, D., Bokoch, G. M., and Nemerow, G. R. (1998a). Adenovirus endocytosis requires actin cytoskeleton reorganization mediated by Rho family GTPases. *J Virol* 72, 8806-8812.
- Li, E., Stupack, D., Klemke, R., Cheresch, D. A., and Nemerow, G. R. (1998b). Adenovirus endocytosis via alpha(v) integrins requires phosphoinositide-3-OH kinase. *J Virol* 72, 2055-2061.
- Lionel, H. O. (1998). *The heart: physiology, from cell to circulation - 3rd edition* (Philadelphia, PA, Lippincott-Raven).
- Lips, D. J., deWindt, L. J., van Kraaij, D. J., and Doevendans, P. A. (2003). Molecular determinants of myocardial hypertrophy and failure: alternative pathways for beneficial and maladaptive hypertrophy. *Eur Heart J* 24, 883-896.
- Lipshitz, H. D., and Smibert, C. A. (2000). Mechanisms of RNA localization and translational regulation. *Curr Opin Genet Dev* 10, 476-488.
- Liu, J., Farmer, J. D., Jr., Lane, W. S., Friedman, J., Weissman, I., and Schreiber, S. L. (1991). Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 66, 807-815.
- Lockette, W., Ghosh, S., Farrow, S., MacKenzie, S., Baker, S., Miles, P., Schork, A., and Cadaret, L. (1995). Alpha 2-adrenergic receptor gene polymorphism and hypertension in blacks. *Am J Hypertens* 8, 390-394.
- Loftus, S. K., Larson, D. M., Watkins-Chow, D., Church, D. M., and Pavan, W. J. (2001). Generation of RCAS vectors useful for functional genomic analyses. *DNA Res* 8, 221-226.
- MacBeath, G., and Schreiber, S. L. (2000). Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. *Science* 289, 1760-1763.

- MacKenna, D. A., Dolfi, F., Vuori, K., and Ruoslahti, E. (1998). Extracellular signal-regulated kinase and c-Jun NH₂-terminal kinase activation by mechanical stretch is integrin-dependent and matrix-specific in rat cardiac fibroblasts. *J Clin Invest* 101, 301-310.
- Maier, L. S., and Bers, D. M. (2002). Calcium, calmodulin, and calcium-calmodulin kinase II: heartbeat to heartbeat and beyond. *J Mol Cell Cardiol* 34, 919-939.
- Mann, D. L. (1999). Mechanisms and models in heart failure: A combinatorial approach. *Circulation* 100, 999-1008.
- Maron, B. J. (1997). Hypertrophic cardiomyopathy. *Lancet* 350, 127-133.
- Martzen, M. R., McCraith, S. M., Spinelli, S. L., Torres, F. M., Fields, S., Grayhack, E. J., and Phizicky, E. M. (1999). A biochemical genomics approach for identifying genes by the activity of their products. *Science* 286, 1153-1155.
- McKinsey, T. A., and Olson, E. N. (1999). Cardiac hypertrophy: sorting out the circuitry. *Curr Opin Genet Dev* 9, 267-274.
- Michels, V. V., Moll, P. P., Miller, F. A., Tajik, A. J., Chu, J. S., Driscoll, D. J., Burnett, J. C., Rodeheffer, R. J., Chesebro, J. H., and Tazelaar, H. D. (1992). The frequency of familial dilated cardiomyopathy in a series of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 326, 77-82.
- Michiels, F., van Es, H., van Rompaey, L., Merchiers, P., Francken, B., Pittois, K., van der Schueren, J., Brys, R., Vandersmissen, J., Beirinckx, F., *et al.* (2002). Arrayed adenoviral expression libraries for functional screening. *Nat Biotechnol* 20, 1154-1157.
- Mills, A. A. (2001). Changing colors in mice: an inducible system that delivers. *Genes Dev* 15, 1461-1467.
- Misquitta, C. M., Iyer, V. R., Werstiuk, E. S., and Grover, A. K. (2001). The role of 3'-untranslated region (3'-UTR) mediated mRNA stability in cardiovascular pathophysiology. *Mol Cell Biochem* 224, 53-67.
- Misquitta, C. M., Mwanjewe, J., Nie, L., and Grover, A. K. (2002). Sarcoplasmic reticulum Ca(2+) pump mRNA stability in cardiac and smooth muscle: role of the 3'-untranslated region. *Am J Physiol Cell Physiol* 283, C560-568.
- Mittmann, C., Eschenhagen, T., and Scholz, H. (1998). Cellular and molecular aspects of contractile dysfunction in heart failure. *Cardiovasc Res* 39, 267-275.
- Mizuguchi, H., and Hayakawa, T. (2001). Characteristics of adenovirus-mediated tetracycline-controllable expression system. *Biochim Biophys Acta* 1568, 21-29.
- Molin, M., and Akusjarvi, G. (2000). Overexpression of essential splicing factor ASF/SF2 blocks the temporal shift in adenovirus pre-mRNA splicing and reduces virus progeny formation. *J Virol* 74, 9002-9009.
- Molin, M., Shoshan, M. C., Ohman-Forslund, K., Linder, S., and Akusjarvi, G. (1998). Two novel adenovirus vector systems permitting regulated protein expression in gene transfer experiments. *J Virol* 72, 8358-8361.
- Molinoff, P. B. (1984). Alpha- and beta-adrenergic receptor subtypes properties, distribution and regulation. *Drugs* 28 Suppl 2, 1-15.

- Morgagni, J. (1769). The seats and causes of diseases. Book II. On diseases of the thorax. Letter XVII, Article 13 (London, Millar and Cadell).
- Netticadan, T., Temsah, R. M., Kawabata, K., and Dhalla, N. S. (2000). Sarcoplasmic reticulum Ca(2+)/Calmodulin-dependent protein kinase is altered in heart failure. *Circ Res* 86, 596-605.
- Ng, D. C., Long, C. S., and Bogoyevitch, M. A. (2001). A role for the extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinases in interleukin-1 beta-stimulated delayed signal transducer and activator of transcription 3 activation, atrial natriuretic factor expression, and cardiac myocyte morphology. *J Biol Chem* 276, 29490-29498.
- Ngan, E. S., Schillinger, K., DeMayo, F., and Tsai, S. Y. (2002). The mifepristone-inducible gene regulatory system in mouse models of disease and gene therapy. *Semin Cell Dev Biol* 13, 143-149.
- Nicol, R. L., Frey, N., and Olson, E. N. (2000). From the sarcomere to the nucleus: role of genetics and signaling in structural heart disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 1, 179-223.
- Nicol, R. L., Frey, N., Pearson, G., Cobb, M., Richardson, J., and Olson, E. N. (2001). Activated MEK5 induces serial assembly of sarcomeres and eccentric cardiac hypertrophy. *Embo J* 20, 2757-2767.
- Onodera, T., Tamura, T., Said, S., McCune, S. A., and Gerdes, A. M. (1998). Maladaptive remodeling of cardiac myocyte shape begins long before failure in hypertension. *Hypertension* 32, 753-757.
- Packer, M., and Cohn, J. N. (1999). Consensus recommendations for the management of chronic heart failure. On behalf of the membership of the advisory council to improve outcomes nationwide in heart failure. *Am J Cardiol* 83, 1A-38A.
- Pascal, J. M., Chennathukuzhi, V. M., Hecht, N. B., and Robertus, J. D. (2001). Mouse testis-brain RNA-binding protein (TB-RBP): expression, purification and crystal X-ray diffraction. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 57, 1692-1694.
- Pennica, D., King, K. L., Shaw, K. J., Luis, E., Rullamas, J., Luoh, S. M., Darbonne, W. C., Knutzon, D. S., Yen, R., Chien, K. R., and et al. (1995). Expression cloning of cardiotrophin 1, a cytokine that induces cardiac myocyte hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 1142-1146.
- Phizicky, E., Bastiaens, P. I., Zhu, H., Snyder, M., and Fields, S. (2003). Protein analysis on a proteomic scale. *Nature* 422, 208-215.
- Pollice, A. A., Smith, C. A., Brown, K., Farkas, D. L., Silverman, J. F., and Shackney, S. E. (2000). Multiparameter analysis of human epithelial tumor cell lines by laser scanning cytometry. *Cytometry* 42, 347-356.
- Post, S. R., Hammond, H. K., and Insel, P. A. (1999). Beta-adrenergic receptors and receptor signaling in heart failure. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39, 343-360.
- Reboul, J., Vaglio, P., Tzellas, N., Thierry-Mieg, N., Moore, T., Jackson, C., Shin-i, T., Kohara, Y., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J., et al. (2001). Open-reading-frame sequence tags (OSTs) support the existence of at least 17,300 genes in *C. elegans*. *Nat Genet* 27, 332-336.

- Rivella, S., Callegari, J. A., May, C., Tan, C. W., and Sadelain, M. (2000). The cHS4 insulator increases the probability of retroviral expression at random chromosomal integration sites. *J Virol* 74, 4679-4687.
- Rodenacker, K., and Bengtsson, E. (2003). A feature set for cytometry on digitized microscopic images. *Anal Cell Pathol* 25, 1-36.
- Rossi, F. M., and Blau, H. M. (1998). Recent advances in inducible gene expression systems. *Curr Opin Biotechnol* 9, 451-456.
- Rubinchik, S., Ding, R., Qiu, A. J., Zhang, F., and Dong, J. (2000). Adenoviral vector which delivers FasL-GFP fusion protein regulated by the tet-inducible expression system. *Gene Ther* 7, 875-885.
- Russell, W. C. (2000). Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol* 81, 2573-2604.
- Ruwhof, C., and van der Laarse, A. (2000). Mechanical stress-induced cardiac hypertrophy: mechanisms and signal transduction pathways. *Cardiovasc Res* 47, 23-37.
- Ryu, D. D., and Nam, D. H. (2000). Recent progress in biomolecular engineering. *Biotechnol Prog* 16, 2-16.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W., and Brown, P. O. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270, 467-470.
- Schiedner, G., Hertel, S., Johnston, M., Biermann, V., Dries, V., and Kochanek, S. (2002). Variables affecting in vivo performance of high-capacity adenovirus vectors. *J Virol* 76, 1600-1609.
- Schumacher, J. M., Lee, K., Edelhoff, S., and Braun, R. E. (1995). Spnr, a murine RNA-binding protein that is localized to cytoplasmic microtubules. *J Cell Biol* 129, 1023-1032.
- Sellers, T. A., and Yates, J. R. (2003). Review of proteomics with applications to genetic epidemiology. *Genet Epidemiol* 24, 83-98.
- Shen, H. (2000). Regular form factor. A new concept and calculating method for quantitative form description. *Anal Quant Cytol Histol* 22, 453-458.
- Shi, Q., Wang, Y., and Worton, R. (1997). Modulation of the specificity and activity of a cellular promoter in an adenoviral vector. *Hum Gene Ther* 8, 403-410.
- Shields, D. C., and O'Halloran, A. M. (2002). Integrating genotypic data with transcriptomic and proteomic data. *Comp Funct Genom*, 22-27.
- Simpson, J. C., Wellenreuther, R., Poustka, A., Pepperkok, R., and Wiemann, S. (2000). Systematic subcellular localization of novel proteins identified by large-scale cDNA sequencing. *EMBO Rep* 1, 287-292.
- Soares, M. B., Bonaldo, M. F., Jelene, P., Su, L., Lawton, L., and Efstratiadis, A. (1994). Construction and characterization of a normalized cDNA library. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 9228-9232.
- Starr, A., Fessler, C. L., Grunkemeier, G., and He, G. W. (2002). Heart valve replacement surgery: past, present and future. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29, 735-738.
- Steinwaerder, D. S., Carlson, C. A., and Lieber, A. (1999). Generation of adenovirus vectors devoid of all viral genes by recombination between inverted repeats. *J Virol* 73, 9303-9313.

- Steinwaerder, D. S., and Lieber, A. (2000). Insulation from viral transcriptional regulatory elements improves inducible transgene expression from adenovirus vectors in vitro and in vivo. *Gene Ther* 7, 556-567.
- Subramanian, V. A., and Patel, N. U. (2001). Current status of MIDCAB procedure. *Curr Opin Cardiol* 16, 268-270.
- Suomalainen, M., Nakano, M. Y., Boucke, K., Keller, S., and Greber, U. F. (2001). Adenovirus-activated PKA and p38/MAPK pathways boost microtubule-mediated nuclear targeting of virus. *Embo J* 20, 1310-1319.
- Tamura, T., Onodera, T., Said, S., and Gerdes, A. M. (1998). Correlation of myocyte lengthening to chamber dilation in the spontaneously hypertensive heart failure (SHHF) rat. *J Mol Cell Cardiol* 30, 2175-2181.
- Tanaka, T., Ogiwara, A., Uchiyama, I., Takagi, T., Yazaki, Y., and Nakamura, Y. (1996). Construction of a normalized directionally cloned cDNA library from adult heart and analysis of 3040 clones by partial sequencing. *Genomics* 35, 231-235.
- Tarnok, A., and Gerstner, A. O. (2002). Clinical applications of laser scanning cytometry. *Cytometry* 50, 133-143.
- Tibbe, A. G., de Grooth, B. G., Greve, J., Dolan, G. J., and Terstappen, L. W. (2002). Imaging technique implemented in CellTracks system. *Cytometry* 47, 248-255.
- Tibbles, L. A., Spurrell, J. C., Bowen, G. P., Liu, Q., Lam, M., Zaiss, A. K., Robbins, S. M., Hollenberg, M. D., Wickham, T. J., and Muruve, D. A. (2002). Activation of p38 and ERK signaling during adenovirus vector cell entry lead to expression of the C-X-C chemokine IP-10. *J Virol* 76, 1559-1568.
- Towbin, J. A., and Bowles, N. E. (2002). The failing heart. *Nature* 415, 227-233.
- Tyers, M., and Mann, M. (2003). From genomics to proteomics. *Nature* 422, 193-197.
- Uetz, P., Giot, L., Cagney, G., Mansfield, T. A., Judson, R. S., Knight, J. R., Lockshon, D., Narayan, V., Srinivasan, M., Pochart, P., *et al.* (2000). A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 403, 623-627.
- Van Regenmortel, M. H. (2001). Proteomics versus genomics. What type of structure-function relationship are we looking for? *J Mol Recognit* 14, 321-322.
- VanLoock, M. S., Yu, X., Kasai, M., and Egelman, E. H. (2001). Electron microscopic studies of the translin octameric ring. *J Struct Biol* 135, 58-66.
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A., *et al.* (2001). The sequence of the human genome. *Science* 291, 1304-1351.
- Vondriska, T. M., Klein, J. B., and Ping, P. (2001). Use of functional proteomics to investigate PKC epsilon-mediated cardioprotection: the signaling module hypothesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280, H1434-1441.
- Waldmuller, S., Freund, P., Mauch, S., Toder, R., and Vosberg, H. P. (2002). Low-density DNA microarrays are versatile tools to screen for known mutations in hypertrophic cardiomyopathy. *Hum Mutat* 19, 560-569.

- Walhout, A. J., Sordella, R., Lu, X., Hartley, J. L., Temple, G. F., Brasch, M. A., Thierry-Mieg, N., and Vidal, M. (2000). Protein interaction mapping in *C. elegans* using proteins involved in vulval development. *Science* 287, 116-122.
- Wang, I. I., and Huang, I. I. (2000). Adenovirus technology for gene manipulation and functional studies. *Drug Discov Today* 5, 10-16.
- Wang, X., and Gerdes, A. M. (1999). Chronic pressure overload cardiac hypertrophy and failure in guinea pigs: III. Intercalated disc remodeling. *J Mol Cell Cardiol* 31, 333-343.
- Wang, Y. (2001). Signal transduction in cardiac hypertrophy--dissecting compensatory versus pathological pathways utilizing a transgenic approach. *Curr Opin Pharmacol* 1, 134-140.
- Wang, Y., DeMayo, F. J., Tsai, S. Y., and O'Malley, B. W. (1997a). Ligand-inducible and liver-specific target gene expression in transgenic mice. *Nat Biotechnol* 15, 239-243.
- Wang, Y., Huang, S., Sah, V. P., Ross, J., Jr., Brown, J. H., Han, J., and Chien, K. R. (1998). Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family. *J Biol Chem* 273, 2161-2168.
- Wang, Y., Xu, J., Pierson, T., O'Malley, B. W., and Tsai, S. Y. (1997b). Positive and negative regulation of gene expression in eukaryotic cells with an inducible transcriptional regulator. *Gene Ther* 4, 432-441.
- Wollert, K. C., Taga, T., Saito, M., Narazaki, M., Kishimoto, T., Glembotski, C. C., Vernallis, A. B., Heath, J. K., Pennica, D., Wood, W. I., and Chien, K. R. (1996). Cardiotrophin-1 activates a distinct form of cardiac muscle cell hypertrophy. Assembly of sarcomeric units in series VIA gp130/leukemia inhibitory factor receptor-dependent pathways. *J Biol Chem* 271, 9535-9545.
- Wright, M. J., Wightman, L. M., Lilley, C., de Alwis, M., Hart, S. L., Miller, A., Coffin, R. S., Thrasher, A., Latchman, D. S., and Marber, M. S. (2001). In vivo myocardial gene transfer: optimization, evaluation and direct comparison of gene transfer vectors. *Basic Res Cardiol* 96, 227-236.
- Wu, S., Gao, J., Wu, Y., Wu, M., Fan, H., Yao, G., Zheng, S., Wang, P., Du, M., Huang, Z., and et al. (1992). Clinical trial on termination of early pregnancy with RU486 in combination with prostaglandin. *Contraception* 46, 203-210.
- Wu, X. Q., and Hecht, N. B. (2000). Mouse testis brain ribonucleic acid-binding protein/translin colocalizes with microtubules and is immunoprecipitated with messenger ribonucleic acids encoding myelin basic protein, alpha calmodulin kinase II, and protamines 1 and 2. *Biol Reprod* 62, 720-725.
- Wu, X. Q., Lefrancois, S., Morales, C. R., and Hecht, N. B. (1999). Protein-protein interactions between the testis brain RNA-binding protein and the transitional endoplasmic reticulum ATPase, a cytoskeletal gamma actin and Trax in male germ cells and the brain. *Biochemistry* 38, 11261-11270.
- Wu, X. Q., Xu, L., and Hecht, N. B. (1998). Dimerization of the testis brain RNA-binding protein (translin) is mediated through its C-terminus and is required for DNA- and RNA-binding. *Nucleic Acids Res* 26, 1675-1680.
- Xu, Z. L., Mizuguchi, H., Mayumi, T., and Hayakawa, T. (2003). Regulated gene expression from adenovirus vectors: a systematic comparison of various inducible systems. *Gene* 309, 145-151.

Yao, J., Coussens, P. M., Saama, P., Suchyta, S., and Ernst, C. W. (2002). Generation of expressed sequence tags from a normalized porcine skeletal muscle cDNA library. *Anim Biotechnol* 13, 211-222.

Yokoyama, S. (2003). Protein expression systems for structural genomics and proteomics. *Curr Opin Chem Biol* 7, 39-43.

Zafeiridis, A., Jeevanandam, V., Houser, S. R., and Margulies, K. B. (1998). Regression of cellular hypertrophy after left ventricular assist device support. *Circulation* 98, 656-662.

Ziauddin, J., and Sabatini, D. M. (2001). Microarrays of cells expressing defined cDNAs. *Nature* 411, 107-110.

Zoltick, P. W., and Wilson, J. M. (2001). Regulated gene expression in gene therapy. *Ann N Y Acad Sci* 953, 53-63.

Zuo, P., and Manley, J. L. (1994). The human splicing factor ASF/SF2 can specifically recognize pre-mRNA 5' splice sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 3363-3367.

G. Abkürzungen / Einheiten

1. Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin konvertierendes Enzym
AS	Aminosäure
ASF	Alternative Splice Factor
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosin-5`-Triphosphat
att	attachment site (DNA-Sequenz zur rekombinatorischen Klonierung)
AV	Adenovirus
C	Cytidin
c	konstanter Faktor
cAMP	zyklisches Adenosin-3`,5`-Monophosphat
cDNA	zur mRNA komplementäre DNA
CFP	cyan fluoreszierendes Protein
cRNA	Transkript einer cDNA
DCM	dilatative Kardiomyopathie
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid-3`,5`-Triphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERK	extracellular signal regulated protein kinase
EST	expressed sequence tag
EtOH	Ethanol
G	Guanin
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
GTP	Guanosin-5`-Triphosphat
HSP	Hitzeschockprotein
lacZ	Gen der β -Galktosidase
LIF	leukemia inhibitory factor
LSC	Laser Scanning Cytometer
MAPK	mitogen activated protein kinase
Max	Maximum
Min	Minimum
MKK	Map-Kinase-Kinase
MOI	multiplicity of infection
MOPS	γ -(Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
ORF	offenes Leseraster
p	Wahrscheinlichkeit der Hypothese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phenylephrin
RFP	rot fluoreszierendes Protein
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA interference

RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase-PCR
RU 486	Mifepriston
ssDNA	Einzelstrang-DNA
T	Thymin
Target	Zielprotein
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCID	tissue culture infectious dosis
TE	Tris-EDTA
TM	Handelsmarke
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Vol	Volumen
WT	Wildtyp
X-Gal	(5-Brom-4-chlor-indolyl)- β -D-galaktosid
YFP	gelb fluoreszierendes Protein
#	Nummerierung
®	registriertes Warenzeichen

2. Einheiten

%	Prozent
Ω	Ohm
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
Bp	Basenpaare
F	Farad
g	Gramm
h	Stunde
Kb	Kilobasenpaare
Kd	Kilodalton
l	Liter
M	Molar
min	Minute
n	Probenumfang
OD	optische Dichte
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenaktivität
s	Sekunde
U	Einheiten
US\$	US Dollar
V	Volt
x g	Erdbeschleunigung

Lebenslauf

Name: Kay Brinkmann

Geburtsort: 37154 Northeim

Geburtsdatum: 10.02.1972

1991: Allgemeine Hochschulreife am Gymnasium Corvinianum, Northeim

1992-1993: Studium der Biologie an der Georg-August-Universität in Göttingen

1994-1999: Studium der Biotechnologie an der Technischen Universität Carola-Wilhelmina in Braunschweig,
Abschluss: Diplom-Biotechnologe

1997: Studienarbeit in der Abteilung „Research / Technology (Biochemie)“ der Aventis AG, Frankfurt (Prof. Dr. L. Fischer, Dr. T. Kiy)

1999: Diplomarbeit im Fachbereich Biowissenschaften der Technischen Universität in Braunschweig durchgeführt in der Abteilung „Target Analysis“ der MediGene AG, Martinsried / München (Prof. Dr. N. Käufer, Dr. M. Funk)

2000-2003: Doktorarbeit im Fachbereich Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität in München, durchgeführt in der Abteilung „Target Validation / Research“ der MediGene AG, Martinsried / München (Prof. Dr. H. Domdey, Dr. T. Henkel, Dr. V. Rönicke)